



Application

微量 (0.1-10ng) サンプルからの Multiplex Library Preparation Method

— LIMprep (Ligation based Illumina Multiplex library PREPreparation method) —
【次世代シーケンスのライブラリー調製における成功事例】 (Illumina社 MiSeq)

製品名

KAPA Library Preparation Kit
KAPA Real-Time Library Amplification Kit
KAPA Library Quantification Kit

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

本稿の全てのデータにつきましては、**理化学研究所発生・再生科学総合研究センター機能ゲノミクスユニット笹川洋平様**のご厚意により掲載させていただきます。ここに深く感謝申し上げます。

はじめに

私は、日本ジェネティクスさんが売り出されている一連のKAPA製品と自作のIndex付きアダプターDNAを使うことで、高感度でロバストな微量サンプル (0.1-10ng) 対応のmultiplex-library preparation methodを完成させました。アプリケーションノートの検証では、同スタートマテリアルからライブラリDNAを作製しており、収量・分布・内容にどれだけブレが生じたか調べています。検証結果を見ていただければ、ライブラリ作製方法が非常に高感度でロバストであることが納得していただけたと思います。検証では100bpの平均サイズ長のゲノムDNAを使用していますが、200bp以上だともっとライブラリ作製効率は高くなります。同ライブラリ作製方法を使用し、様々なスタートマテリアルから得られたライブラリDNAをHiSeq1000/2000で検出し、良好な結果を得ています。(当実験はMiSeqを使用)

KAPA製品には他社さんには無いアドバンテージが2つあります。1つ目は、KAPA real-time library amplification kit。PCR-enrichmentでのover-amplificationを未然に防ぎます。over-amplificationすると、ライブラリDNA同士がくっつき正確なサイズがわからなくなるトラブルが生じますし、余計なPCRバイアスにつながります。SybrGreen耐性のエンジニアリング酵素なので、得られた指標と成るPCRサイクルはほぼ予想通りの収量を反映します。2つ目は強力なエンジニアPCR酵素KAPA HiFi DNA polymeraseをはじめとするキットに含まれる酵素の優位性です (各キットのアプリケーションノート参照)。今回使用したKAPA製品全てにおいて、どのロットも安定して高品質でした。

ネックとなるのは自作アダプターの件だと思います。方法の導入を検討されるのであれば、日本ジェネティクスさんを通じてご連絡ください。良いシーケンスは、良いライブラリ作製から。皆さんのシーケンスライフが爽り多いことを願って。

2012/7/27 笹川洋平



お客様のコメント

LIMprep法が応用されている研究論文が、2013年4月にGenome Biology誌にて発表されました。詳細プロトコルも完全公開され、弊社のKAPA Library Preparation Kit製品ページからダウンロードいただけます。本稿3ページの「参考文献」をご覧ください。

方法

断片化した10ngのマウスゲノムDNAを用い、以下のキットによりライブラリー (n=9) を調製し、Illumina社MiSeqにて評価しました。

初発サンプル	: 断片化したマウスゲノムDNA 10ng
ゲノムDNA断片化方法	: Covaris S220 (エムエス機器社) を100bpの標準設定どおり使用
ライブラリー調製キット	: KAPA Library Preparation kit (KAPA Library Amplification kitを含む)
ライブラリー増幅のサイクル確認	: KAPA Real-Time Library Amplification kit
ライブラリー増幅用試薬	: KAPA Library Amplification kit (KAPA HiFi HotStart enzyme)
ライブラリー定量キット	: KAPA Library Quantification kit
次世代シーケンサー	: Illumina社MiSeq

[LIMprep Workflow]

<Start material>	10ng fragmented mouse genome DNA (n=9)
<KAPA library preparation kit>	End-repair, dA-tail, adaptor ligation
<KAPA real-time library amplification kit>	Determination of PCR cycle
<KAPA library amplification kit>	PCR enrichment
<Resulted Library DNA>	Quantified by pico-green Average: 73.8±4.8 ng, CV: 0.066
<Quantified by qPCR>	1ng Library DNA / gene locus (n=9) Detected 8 gene locus (A-H)
<KAPA library quantification kit>	Final QC
<MiSeq Run>	SE50bp

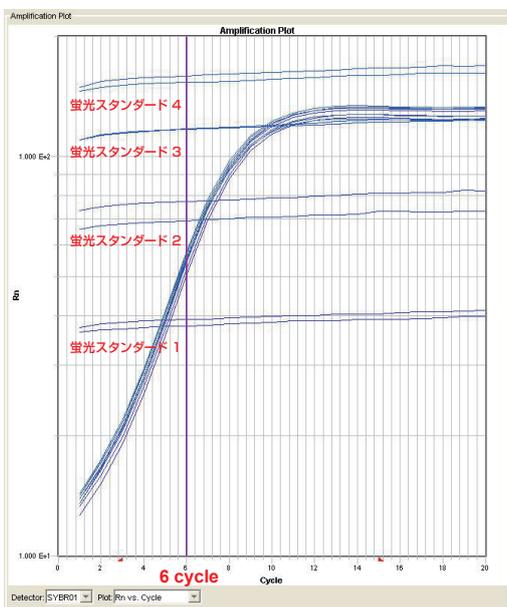
* LIMprep: Ligation-based Illumina Multiplex library PREPreparation method for low amount DNA using TruSeq adaptor and KAPA library preparation kit

結果

[LIMprep Workflow]

<Start material>	10ng fragmented mouse genome DNA (n=9)
<KAPA library preparation kit>	End-repair, dA-tail, adaptor ligation
<KAPA real-time library amplification kit>	Determination of PCR cycle ①
<KAPA library amplification kit>	PCR enrichment
<Resulted Library DNA>	Quantified by pico-green Average: 73.8±4.8 ng, CV: 0.066 ②, ③
<Quantified by qPCR>	1ng Library DNA / gene locus (n=9) Detected 8 gene locus (A-H)
<KAPA library quantification kit>	Final QC
<MiSeq Run>	SE50bp

① PCR cycleの決定。高感度なシステム。



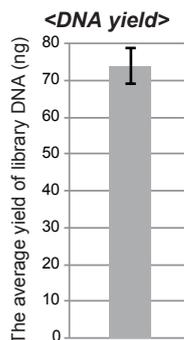
<KAPA real-time library amplification kit> Determination of PCR cycle

ライブラリーの増幅では、増幅時のバイアスを最小限にするため、可能な限り最少のサイクル数で、かつ次世代シーケンスに必要なライブラリー量に達するような、最適なサイクル数を決定することが、大変重要となります。今回の結果からは、4~6サイクルが最適な最少サイクル数と決定されました。(当実験では、6サイクルでの実施を決定しました。)

【解説(日本ジェネティクス)】

KAPA Real-Time Library Amplification Kitは、ライブラリー増幅用のエンジニア酵素 "KAPA HiFi HotStart enzyme" をベースに、最適な最少サイクル数を高感度なリアルタイムPCRで確認できるように開発された製品です。2×マスターミックスには4濃度の蛍光スタンダードが添加されており、蛍光スタンダード1~3付近で最適なライブラリー濃度が得られるよう設計されています。これにより、常に安定した濃度のライブラリーを、最少のサイクルで得ることが可能となるため、ライブラリーの品質の安定化が見込めます。

② 6サイクルにおけるDNA量・CV。安定した収量。

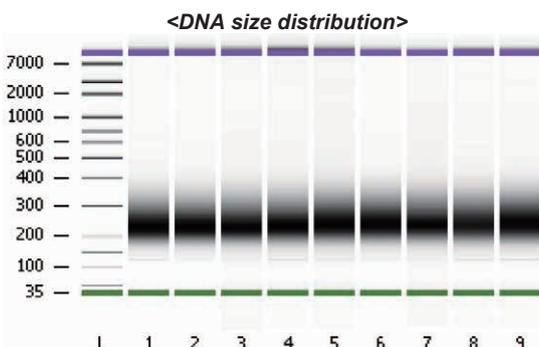


<KAPA library amplification kit>

PCR enrichment
Quantified by pico-green Average: 73.8±4.8 ng, CV: 0.066

当実験では、同一DNAサンプルからのライブラリー調製 (n=9) で、73.8±4.8ng (CV=0.066) という安定した量のライブラリーを、安定したサイズ分布で得ることが可能でした。

③ BAによる分布の確認。安定した分布。



【解説(日本ジェネティクス)】

KAPA Library Preparation Kitには、End-repair用酵素、dA-tail用酵素、Adaptor ligation用酵素以外に、ライブラリー増幅用のKapa Library Amplification Kit (KAPA HiFi HotStart enzyme) が含まれています。KAPA HiFi HotStart enzymeは、高い正確性を持ち、しかも、高いGC含量/AT含量の配列の増幅においてもバイアスが最小限に抑制され、かつ、安定した増幅結果を得ることが可能です。

英国 Wellcome Trust Sanger研究所においても、本エンジニア酵素によるNGSライブラリーのバイアス低減の有用性が検証されました。

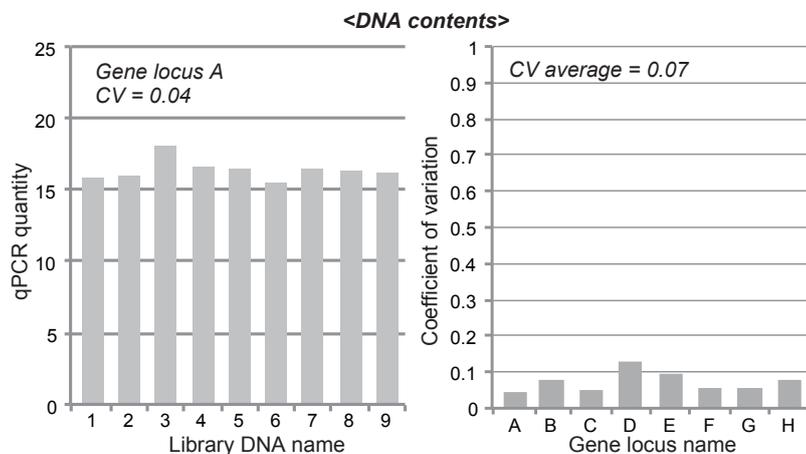
Michael A Quail et al., Optimal enzymes for amplifying sequencing libraries, Nature Methods 9, 10-11 (2012)

結果 (つづき)

[LIMprep Workflow]

<Start material>	10ng fragmented mouse genome DNA (n=9)	
<KAPA library preparation kit>	End-repair, dA-tail, adaptor ligation	
<KAPA real-time library amplification kit>	Determination of PCR cycle	
<KAPA library amplification kit>	PCR enrichment	
<Resulted Library DNA>	Quantified by pico-green Average: 73.8±4.8 ng, CV: 0.066	
<Quantified by qPCR>	1ng Library DNA / gene locus (n=9) Detected 8 gene locus (A-H)	4
<KAPA library quantification kit>	Final QC	
<MiSeq Run>	SE50bp	5

4 qPCRによる内容の確認。内容も安定している。



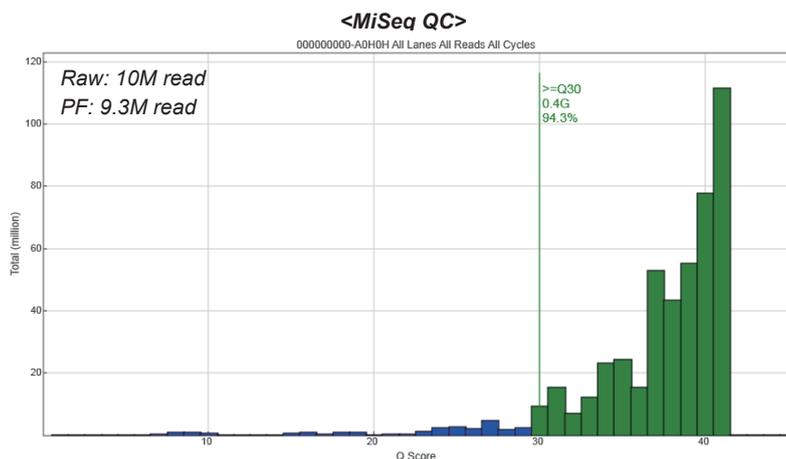
<Quantified by qPCR>

1ng Library DNA / gene locus (n=9) Detected 8 gene locus (A-H)

KAPA HiFi HotStart enzymeで増幅したライブラリーにおいて、同一DNAサンプルから調製したライブラリー間で配列が偏って増幅されていないかチェックするため、8種類のlocus (A ~ H) について、リアルタイムPCRで定量を実施しました。

当実験では、locus Aにおける9ライブラリー間のCV=0.04、同様にlocus A ~ Hの平均CV=0.07と、増幅に偏りが少ないライブラリー DNAであることが確認されました。

5 MiSeqによる確認。シーケンス可能。



<KAPA library quantification kit>

<MiSeq Run>
SE50bp

最終チェックとしてKAPA Library Quantification Kitでライブラリー濃度を決定し、MiSeqのシングルエンドリード50bpでシーケンスを実施しました。

結果として、RAWリード10M read(パスフィルターリード9.3M read)で、Q30以上が0.4G base (94.3%) という高い品質のシーケンスデータが得られました。

【解説 (日本ジェネティクス)】

KAPA Library Quantification Kitは、PCR阻害物質であるSYBR GreenIIに耐性を持つエンジニア酵素をベースとしたリアルタイムPCRによるライブラリーの定量キットです。GC/AT含量に偏りがあるヘテロな配列でも安定して増幅できる「マスターミックス」、厳密に品質管理された「6濃度に希釈済みのスタンダードDNA」と「プライマー」により、一貫して安定的なライブラリー定量結果を得ることが出来ます。

参考文献

LIMprep法が応用されている研究論文が2013年4月にGenome Biology誌にて発表されました。

Yohei Sasagawa, Itoshi Nikaido, Tetsutaro Hayashi, Hiroki Danno, Kenichiro D Uno, Takeshi Imai and Hiroki R Ueda, Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity, Genome Biology 2013, 14:R31 (doi:10.1186/gb-2013-14-4-r31)

LIMprep法の詳細プロトコルは、弊社のKAPA Library Preparation Kit製品ページからダウンロードいただけます。ご不明な点は弊社までお問い合わせください。ご連絡先：日本ジェネティクス株式会社 info@genetics-n.co.jp