



Application

アジレント・テクノロジー社SureSelect XTターゲットエンリッチメントシステムを用いた、微量FFPEゲノムDNA (50ng) からのエクソームシーケンシング

製品名

KAPA Hyper Prep Kit (KK8500, KK8502)

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 統合生命医科学研究センター ゲノムシーケンス解析研究チーム 中川 英刀 様 前嶋 和紘 様のご厚意により掲載させていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

はじめに

FFPE (formalin-fixed paraffin embedded : ホルマリン固定パラフィン包埋) 組織サンプルから抽出したゲノム DNA の次世代シーケンス解析は、特に臨床研究分野において、大変重要なアプリケーションのひとつとして期待されています。

一方で、FFPE サンプル特有の以下のような要因により、実際には難易度が高いことで知られています。

- DNA の劣化(断片化や、加水分解によるシトシンからウラシルへの置換)
- ホルムアルデヒドを介したタンパク-DNA 間のクロスリンク
- DNA の抽出効率が悪い(微量な検体)

一般的に、このような FFPE 由来のゲノム DNA を用いた場合、シーケンスに必要なライブラリー量が得られ難いため、シーケンスデータの解析において、結果的に duplication rate が高く、十分な coverage や sequence depth が得られないことが問題となります。

ここでは、SureSelect XT ターゲットエンリッチメントシステム (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いた FFPE 組織サンプルの WES (Whole-exome sequencing) 解析において、KAPA Hyper Prep Kit と組み合わせることで、非常に期待される改善結果が得られた事例をご紹介します。

KAPA Hyper Prep Kit および SureSelect XTターゲットエンリッチメントシステム (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いたWESライブラリー調製ワークフロー

- ① ゲノムDNAの抽出 (FFPEサンプルの脱パラフィン等の前処理とDNA抽出はQIAamp DNA FFPE Tissue Kitを使用)
Agilent TapeStationもしくはバイオアナライザによるサイズ分布チェック

- ② ゲノム DNA の断片化

- ③ End-repair, dA-tailing

- ④ Adapter-ligation

- ⑤ AMPureXP 精製

- ⑥ ライブラリー増幅 (キャプチャ前)

- ⑦ AMPureXP 精製

- ⑧ Agilent TapeStationもしくはバイオアナライザによるサイズ分布チェックおよび濃度確認

- ⑨ Pre Capture PCR Product の濃縮

- ⑩ SureSelect Library Capture

- ⑪ ライブラリー増幅 (キャプチャ後)

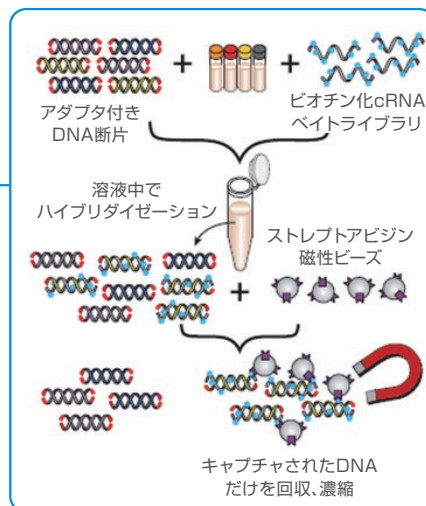
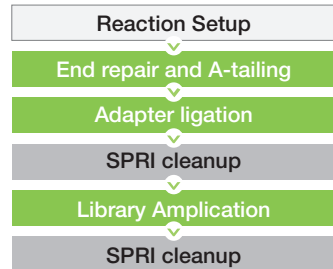
- ⑫ AMPureXP 精製

- ⑬ Agilent TapeStationもしくはバイオアナライザによるサイズおよび濃度確認

- ⑭ ライブラリーのプール

- ⑮ 次世代シーケンシング (illumina HiSeq2500)

KAPA Hyper Prep Kit のワークフロー





KAPA Hyper Prep Kit および SureSelect Adapter を使用したFFPE Genome DNA からの PreCapture PCR Product の作製

① FFPE ゲノム DNA の調製

Picogreen で濃度測定
qPCRでの FFPE DNA の品質評価
50ng~200ng の FFPE ゲノム DNA を 50 μ L 調製する (Volume up には 1x Low TE を使用)

② Covaris 処理

SureSelect XT Kit の Protocol に従い、Covaris を用いて DNA の断片化をする
Cycle 数は 3 cycles に設定 (60sec, 3 cycles, total 180sec)

(例) Covaris S2 の設定

Duty Cycle	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
時間	60sec, 3cycles
セットモード	Frequency sweeping
温度	4 $^{\circ}$ C ~ 7 $^{\circ}$ C

③ End Repair & A-Tailing

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い、End Repair および A-Tailing を行う

反応液の組成

Fragmented DNA	50 μ L
End Repair & A-Tailing Buffer	7 μ L
End Repair & A-Tailing Enzyme	3 μ L
Total Volume per well	60 μ L

Thermal Cycler の設定

20 $^{\circ}$ C	30min	1 cycle
65 $^{\circ}$ C	30min	
4 $^{\circ}$ C	∞	

サーマルサイクラーの HotTop は OFF にします

④ Adapter Ligation

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い、Adapter Ligationを行う

反応液の組成

End Repair & A-Tailing reaction Product	60 μ L
Nuclease-Free Water (※)	5 μ L
Ligation Buffer	30 μ L
DNA Ligase	10 μ L
SureSelect Adapter Oligo Mix (※)	5 μ L
Total Volume per well	110 μ L

Thermal Cycler の設定

20 $^{\circ}$ C	15min	1 cycle
4 $^{\circ}$ C	∞	

サーマルサイクラーの HotTop は OFF にします

※ Adapter は、FFPE gDNA のクオリティ次第で、原液を使用するか、希釈液を使用するか、増やすかを定める
Adapter 量を増やす場合は、Nuclease-Free Water を減らす

⑤ Post-Ligation Clean up

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い Clean up を行う
Elution は Nuclease-Free Water 20 μ L で行う

⑥ Library Amplification (PreCapture PCR)

Primer 量を 2.5 μ L、Annealing 温度を 65 $^{\circ}$ C に変更し、PCR を行う

反応液の組成

Adapter-Ligated Library	20 μ L
2x KAPA Hi-Fi HotStart Ready Mix	25 μ L
SureSelect Primer	2.5 μ L
SureSelect ILM Indexing PreCapture PCR Reverse Primer	2.5 μ L
Total Volume per well	50 μ L

Thermal Cycler の設定

98 $^{\circ}$ C	45sec	1 cycle
98 $^{\circ}$ C	15sec	14 cycle (※)
65 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	1min	1 cycle
4 $^{\circ}$ C	∞	1 cycle

(※) DNA の出発量に応じて、PCR サイクル数を最適化します。SureSelect のハイブリダイゼーションには 750ng の収量が必要です。

⑦ Post-Amplification Clean up

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い、PCR Product の Clean up を行う
Elution は Nuclease-Free Water 30 μ L で行う

⑧ TapeStationもしくはバイオアナライザで評価

TapeStation D1000 もしくは、Bioanalyzer DNA1000 を用いて、PreCapture PCR Product の評価を行う

⑨ PreCapture PCR Product の濃縮

PreCapture PCR Product 750ng (推奨750ng、最低必要量 500ng) を濃縮 (Thermo Scientific 社 SpeedVac DNA120 を使用)
Nuclease-Free Water 3.4 μ L で溶解

⑩ Hybridization ~ Capture Library の作製

Agilent SureSelect XT Human All Exon V5とハイブリダイゼーション試薬を用い、SureSelect XT Kit の Protocol に従って、Hybridization から行う

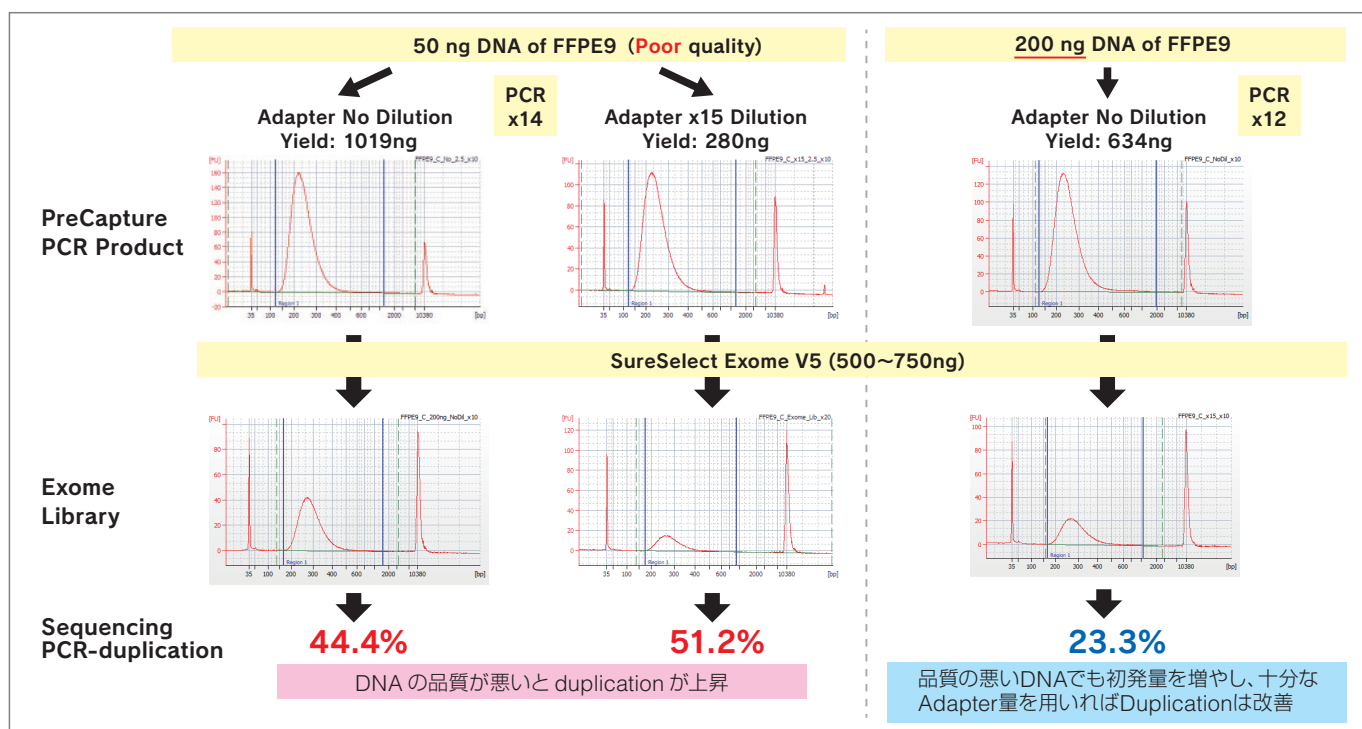
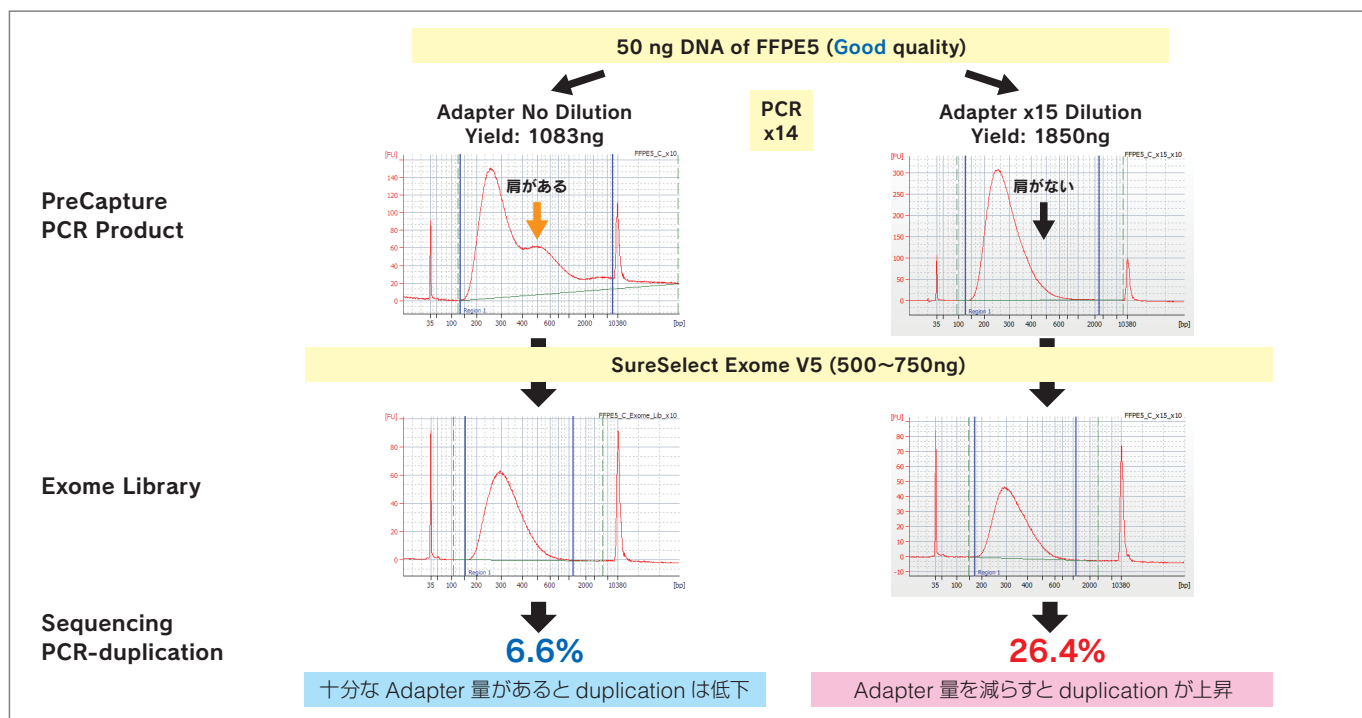
⑩以降は、Agilent SureSelect XT kitのプロトコルに従い操作

SureSelect XTライブラリの評価

キャプチャライブラリ試薬：SureSelect XT Human All Exon V5

Sample Name	DNA quality *	Input DNA [ng]	PCR Cycles	Adapter dilution	Pre-capture Yield [ng]	comment	Hybridization amount [ng]	Post-capture Yield [ng]
FFPE7_Cancer	Good	50	14	No	1179	2nd peak around 400-1000bp	750	264
FFPE5_Cancer	Good	50	14	No	1083	2nd peak around 400-1000bp	500	402
FFPE2_Cancer	Medium	50	14	No	1340	2nd peak around 400-1000bp	500	157
FFPE3_Cancer	Medium	50	14	No	1694	2nd peak around 400-1000bp	500	122
FFPE4_Cancer	Medium	50	14	No	1231	2nd peak around 400-1000bp	750	460
FFPE9_Cancer	Poor	50	14	No	1019		500	114
	Poor	200	12	No	634		634	187

* Use original qPCR method for FFPE DNA quality evaluation, not published.





NGS結果 (2014年9月下旬時点解析中)

Sample Name	DNA quality *	Input DNA [ng]	Initial fastq	Mapped	mapping rate	duplication rate	on target rate
FFPE7_Cancer	Good	50	67,960,522	62,814,748	92.4%	8.2%	66.8%
FFPE5_Cancer	Good	50	70,034,926	67,040,360	95.7%	6.6%	66.0%
FFPE2_Cancer	Medium	50	72,517,124	67,819,596	93.5%	14.0%	67.9%
FFPE3_Cancer	Medium	50	63,595,416	59,910,508	94.2%	15.8%	69.1%
FFPE4_Cancer	Medium	50	63,394,208	60,942,730	96.1%	7.2%	65.0%
FFPE9_Cancer	Poor	50	109,083,544	91,226,884	83.6%	44.4%	57.2%
	Poor	200	69,105,486	63,668,336	92.1%	23.4%	66.6%

* Use original qPCR method for FFPE DNA quality evaluation, not published.

まとめ

- FFPE の DNA50ng (生検サンプル) からでも Exome Seq が可能である
- qPCR によって評価した FFPE の “質” によって、performance が異なる
- Adapter は過剰量入れたほうが収量が上がり、Duplication を抑制できる可能性がある
- ライブラリー作製時に “Hump” が出現するか否かが、PCR duplication の割合などの FFPE DNA Sequencing の可否と関連する可能性がある



お客様のコメント

臨床データの豊富さや希少疾患(腫瘍)への解析のため、FFPEサンプルのNGS解析が、今後、求められています。また、臨床シーケンスへの展開を考えた場合、過去の生検標本など微量なFFPE 標本からのDNAに対するNGS解析に適した方法の確立が必要になります。FFPE 標本からのDNAは、PCR duplicationが非常に多く(時には50%以上)、データの質も悪いから、...と敬遠しておりましたが、KAPA Hyper Prep Kit のライブラリー構築の効率の良さは、驚くべきものでした。KAPA Hyper Prep Kit は、FFPEを用いての臨床シーケンスの手法に大きなインパクトをあたえることは間違いありません。特に、臨床シーケンスを考えた場合、生検のFFPEしか癌組織がないような状況が多々あり、KAPA Hyper Prep Kit だと、生検のFFPEの数スライスからのDNA (50-100ng程度) でも効率よくNGSライブラリーの構築ができる可能性があるため、非常に有望です。

<日本ジェネティクス株式会社からのコメント>

限られた時間でこれだけ良好な結果を出していただき、中川先生と前嶋様には大変感謝しております。

一般的にはFFPEサンプルなどの微量DNAサンプルからNGSライブラリーを作製する際は、過剰なアダプターがダイマーを形成し易いため、テンプレートに適したアダプター量のご検討が重要となります。さらにシーケンスに必要なライブラリー量が得られ難いため、シーケンスデータの解析において、結果的に duplication rate が高くなり、十分な coverage や sequence depth が得られないことが問題となります。

KAPA Hyper Prep Kit は試薬とプロトコルを大幅に改良したことにより、非常に高いアダプターライゲーション効率を実現できました。今回、この優れた性能がFFPE由来のゲノムDNAでもアダプターを希釈しない条件で高効率にライブラリーを作製し、良好な低い Duplication Rateを得ることに繋がったと考えられます。

KAPA Hyper Prep Kit illumina用ライブラリー調製キット

KAPABIOSYSTEMS

New



Cat.No	包装単位	保存条件	キット内容
KK8500	Hyper Prep Kit 8回用	-20℃で製造日より1年間保管できます。	• エンドリペア&A-テリング バッファー • エンドリペア&A-テリング 酵素 • ライゲーションバッファー
KK8502	Hyper Prep Kit 24回用		• DNAライゲース • HiFi HotStart ReadyMix • ライブラリー増幅プライマーミックス
KK8504	Hyper Prep Kit 96回用		*アダプターは含まれておりません。 *磁気ビーズ AMPure XP* は含まれておりません。

アジレント・テクノロジー社 ターゲットキャプチャキット

SureSelect Target Enrichment plus Adapter TPFD-KB ILM, 96



Cat.No. : 931171

キット内容 : ハイブリ用試薬、Adapter、Primer、96インデックス (96反応)

KAPA BIOSYSTEMS社ライブラリー調製キットとSureSelectを組み合わせて使う時に必要な試薬の入ったキットです。

SureSelectのハイブリダイゼーション用の試薬キットに、AdapterとSureSelectキャプチャ前後の増幅に必要なPrimer、96インデックスが付属しています。

本キットのPrimerは必ず、本キットに含まれるAdapterとセットでご利用ください。また別途、適切なSureSelect XTキャプチャライブラリをお求めください。

アジレント製品につきましては、アジレント・テクノロジー株式会社からの販売となります。下記にお問い合わせください。

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

仕様は予告なく変更する場合があります。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2014_SEP

