

Application

長期間エタノールに浸漬されたマメジカの耳片からの MtDNA の配列決定

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、東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター 石毛 太郎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

長期保存したサンプルから抽出した DNA は、総じて微量および劣悪な品質である。そこで、微量および劣悪なサンプルからライブラリーを作製できる KAPA Hyper Prep Kit を使用し、問題なくデータを得られたので報告する。

実験条件

初発サンプル量 : total DNA Table2参照
 生物種 : マメジカ
 DNA抽出法 : 18年前東南アジアにて、エタノールに浸漬し-80℃にて保存したマメジカの耳片
 DNA抽出 : QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit
 DNA断片化方法 : Covaris
 ライブラリー調整 : KAPA Hyper Prep Kit for illumina
 アダプター* : KAPA Adapter Kit
 シーケンサー : HiSeq2500 (illumina)

*日本ジェネティクス補足：現在は、FastGene™ Adapter Kit (イルミナ用) (Cat.No. FG-NGSAD24) を推奨しております。

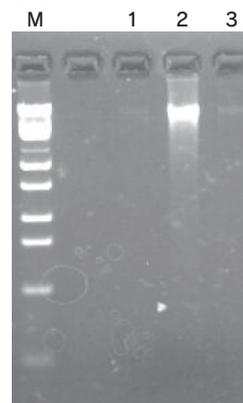
ライブラリー調製ワークフロー

- ① ゲノムDNAの抽出 (QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit) を使用
アガロースゲル電気泳動によるDNAの性状チェックおよびQubitによる濃度測定
- ② ゲノムDNAの断片化 (covaris : 500bp)
- ③ End-repair, dA-tailing
- ④ Adapter-ligation
- ⑤ AMPureXP 精製
- ⑥ ライブラリー増幅
- ⑦ AMPureXP 精製
- ⑧ Pippin PrepによるSize Selection
ゲルカセット : 2.0%
- ⑨ Agilent バイオアナライザーによるサイズ分布チェック
- ⑩ Kapa Library Quantification Kitsによる濃度測定
- ⑪ ライブラリーのプール (1%PhiX混入)
- ⑫ 次世代シーケンス (illumina HiSeq 2500)

KAPABIOSYSTEMS
KAPA Hyper Prep Kit

結果

- ① ゲノムDNAの抽出 (QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit) を使用
アガロースゲル電気泳動によるDNAの性状チェックおよびQubitによる濃度測定



M: 2.5kb ladder
 1: マメジカ耳片 1
 2: マメジカ耳片 2
 3: マメジカ耳片 3

図1. 抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動

Table1. Qubitで測定したDNA抽出量

name	Qubit (ng/μl)	Bio spec (ng/μl)
1	4.62	11.2
2	9.8	12.6
3	too low	1.8

Table2. ライブラリー作製に用いたDNA量

name	input DNA (μl)	input DNA (ng)	
		Qubit	Bio spec nano
1	20	92.4	224
2	10.2	99.96	128.52
3	40	too low	72

結果

② ゲノムDNAの断片化 (covaris : 500bp)

Table3. ライブラリー作製に用いたDNA量

name	Qubit (ng)
1	too low
2	1.66
3	0.41

④ Adapter-ligation

Table4. Adapter-ligationにおけるAdapterの量

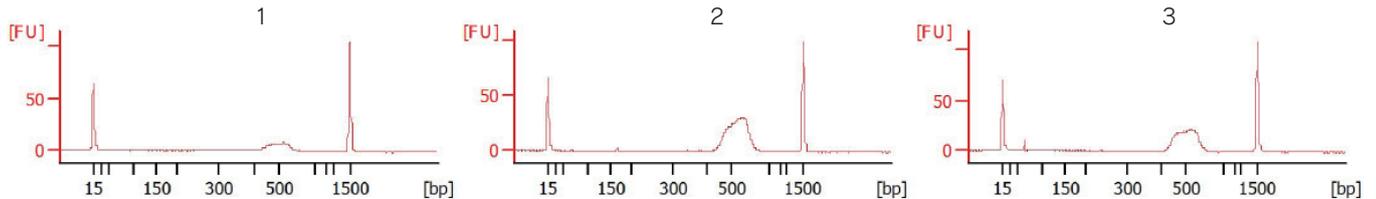
name	ストック濃度	1反応あたり添加量 (total 110 μL)	最終濃度
1	750nM	5 μL	34nM
2	15 μM	5 μL	680nM
3	7.5 μM	5 μL	340nM

⑥ ライブラリー増幅

Table5. PCR cycle数

name	PCR cycle数
1	12
2	8
3	10

⑧ Pippin PrepによるSize Selection



⑩ 次世代シーケンス (illumina HiSeq 2500)

Table6. シーケンス結果

Sample Name	Sample Ref	Index	Control	Yield (Mbases)	% PF	# Reads	% of raw clusters per lane	% Perfect Index Reads	% One Mismatch Reads (Index)	% of >= Q30 Bases (PF)	Mean Quality Score (PF)
1	N	GCCAAT	N	10,367	100	103,666,038	35.02	98.99	1.01	93.73	36.58
2	N	ATCACG	N	9,594	100	95,938,014	32.41	99.19	0.81	93.39	36.48
3	N	CTTGTA	N	9,048	100	90,476,788	30.56	99.1	0.9	93.41	36.46

Table7. de novoアッセムブリの結果

Sample Name	N75	N50	N25	Minimum	Maximum	Average	Count	Total
1	1,119	1,268	1,661	651	175,450	1,455	33,956	49,418,356
2	1,136	1,283	1,540	712	31,211	1,333	81,957	109,238,541
3	1,132	1,273	1,522	644	48,192	1,334	73,867	98,512,409

Table8. de novoアッセムブリ(つづき)の結果

Sample Name	Consensus length (bp)	total reads	Average coverage
1	16,356	29,814	178.13
2	16,329	52,264	312.95
3	16,312	34,226	205.3

●まとめ

初発量不明の sample 3 においても、Qscore >30 の read が93%以上の非常に高品質の read 情報を得ることが出来た。
CLC Genomics Workbench での De Novo assembly により、全てのサンプルで MtDNAのほぼ全長を決定することが出来た。


お客様のコメント

非常に低濃度かつ状態の悪いDNAからもライブラリーを作成することができたため、エインセントDNAのライブラリー作成にも有効ではないかと考えられる。
Covarisを使ったため、断片化したDNAのロスが大きいため、ここを解決する必要があると思われた。