



Application

KAPA HyperPlus Kitを用いた植物サクラソウの全ゲノムシーケンス

製品名

KAPA HyperPlus Kit (for illumina) (KK8510, KK8512, KK8514)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、株式会社ファスマック 勝又 啓史 様、京都大学大学院 人間・環境学研究所 瀬戸口研究室 山本 将也 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

植物において、SSR (simple sequence Repeat) マーカーを用いた解析手法は、品種の識別や同定において非常に有効である。近年は、次世代シーケンサーの普及により、これまでに遺伝子配列が決定されていない植物種においても、より幅広く効率的にSSRマーカーを探索することが可能となってきている。これにより、例えば絶滅が危惧されるような希少な植物種の保護やその環境保全を目的としたSSRマーカーの探索も可能となる。今回、サクラソウ属5種から抽出したゲノムDNAからKAPA HyperPlus Kitを用いてライブラリーを調製し、MiSeqで全ゲノムシーケンスを実施することで、これらの識別を可能とするSSRマーカーの探索を試みた。

実験条件

Input DNA : サクラソウ属5種のゲノムDNA (GC 35%程度)

サクラソウ (*Primula sieboldii*) : Psi

イワザクラ (*Primula tosaensis*) : Pto

コイワザクラ (*Primula reinii*) : Pre

チチブイワザクラ (*Primula reinii var. rhodotricha*) : Prh

オオミネコザクラ (*Primula reinii var. okamotoi*) : Pok

Input DNA量 : 250ng-500ng

Input DNA抽出方法 : CTAB法 (Kitは使用しない)

Input DNAバッファー組成 : TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)

断片化Kit : KAPA HyperPlus Kit

断片化温度 : 37°C



京都大学大学院 人間・環境学研究所 瀬戸口研究室では、植物の系統分類や系統地理学を基盤とした進化多様性に関する研究を行っています。上記の写真は、本研究室で研究している植物の一種である「サクラソウ」の写真です。

結果

まずは、断片化前のサンプルの濃度をQubitを用いて測定し、さらに電気泳動を行い、サンプルの状態を確認した。

Table 1. Qubit(dsDNA HighSensitivity) により測定したサンプル濃度

サンプル	濃度 [ng/μL]	260/280	260/230
サクラソウ :Psi	62.7	1.9	1.92
イワザクラ :Pto	47.6	1.84	1.81
コイワザクラ :Pre	35.2	1.85	1.82
チチブイワザクラ :Prh	133	1.85	1.77
オオミネコザクラ :Pok	15.4	1.84	1.52

ポイント

全サンプルともTE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1.0mM EDTA) に溶出してあったため、Conditioning Solutionをプロトコルの記載に従い、使用した。

例) final EDTA conc. = 0.1mM

EDTA 0.1mM Conditioning solution :

Conditioning solution (per 100 μL) 6.5 μL

PCR-grade water (per 100 μL) 93.5 μL

Psiのみ分解されていることがわかった。

● 泳動条件

1.5%TAEゲル 100V 約40min(流れ方を見て止める)

染色試薬 : GelRed (Biotium 社)

染色方法 : 後染め

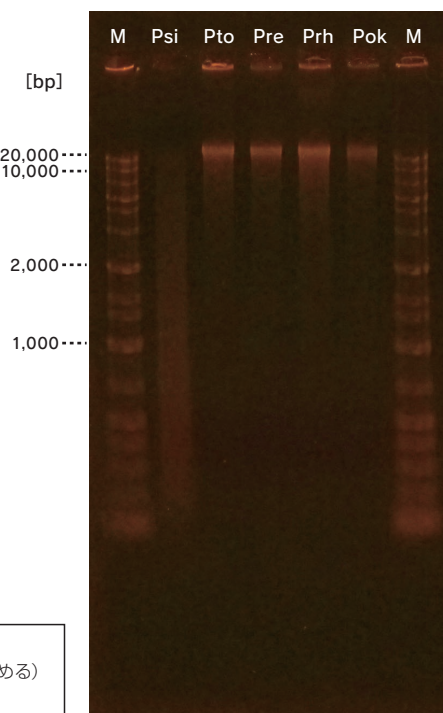


Fig. 1. サンプルの電気泳動結果

次に、断片化条件の検討を行った。

チチブイワザクラ (Prh) の濃度が他の濃度よりも高かったため、このサンプルを断片化条件の検討に用いた。

温度 37℃、時間 3min, 5min, 10min で断片化を行い、ライブラリー増幅後 (3cycle) Qubit および Bioanalyzer によりサイズ分布を確認した。
(※ライブラリー増幅前にサイズセレクションは行わない)

Table 2. Qubit(dsDNA HighSensitivity) により測定したサンプル濃度

断片化時間	濃度 [ng/μL]	液量 [μL]
3min	24.6	23
5min	26.5	23
10min	24.8	23

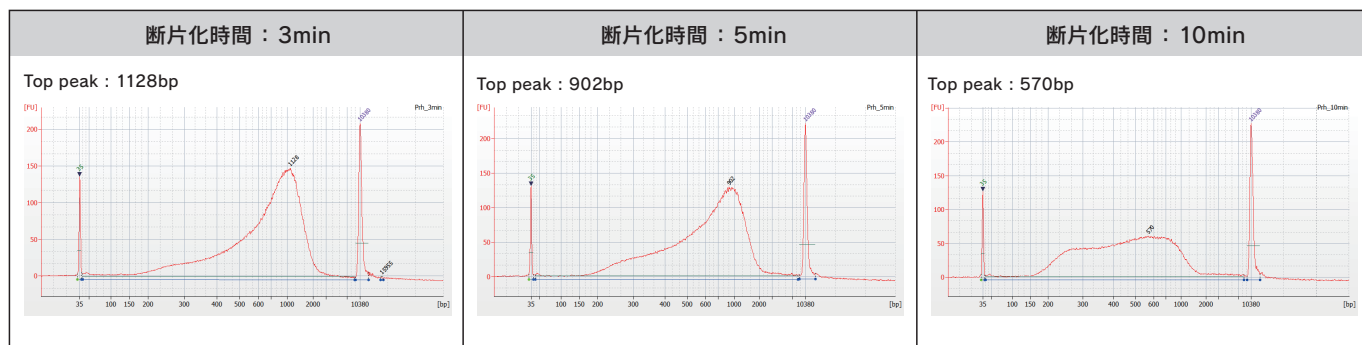


Fig 2. それぞれの断片化時間における Bioanalyzer の結果

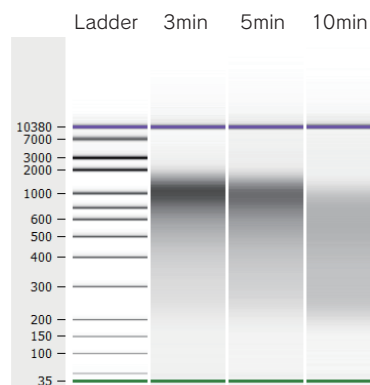
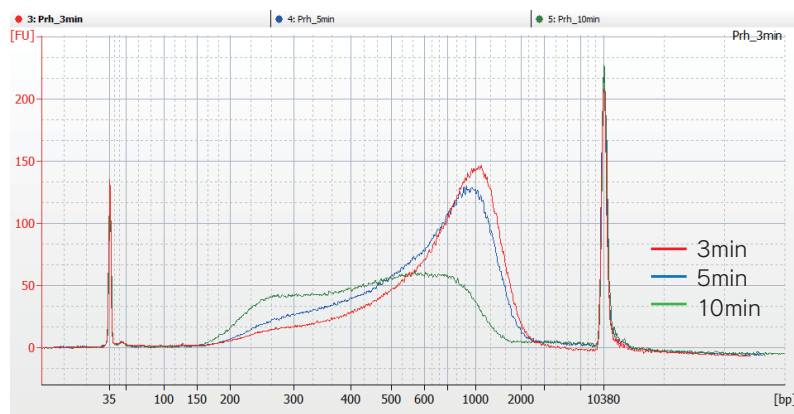


Fig 3. 3つの断片化時間を重ね合わせた Bioanalyzer の結果

確認後、自動切り出し装置 Caliper LabChip XT (PerkinElmer) で切り出しを行った。(600±10%)
以上の結果により、目的サイズ600bpの断片化条件を37℃、7.5minとした。

残り4種のライブラリー調製を行った。

上記の断片化条件の最適化により37℃、7.5minを採用することにした。



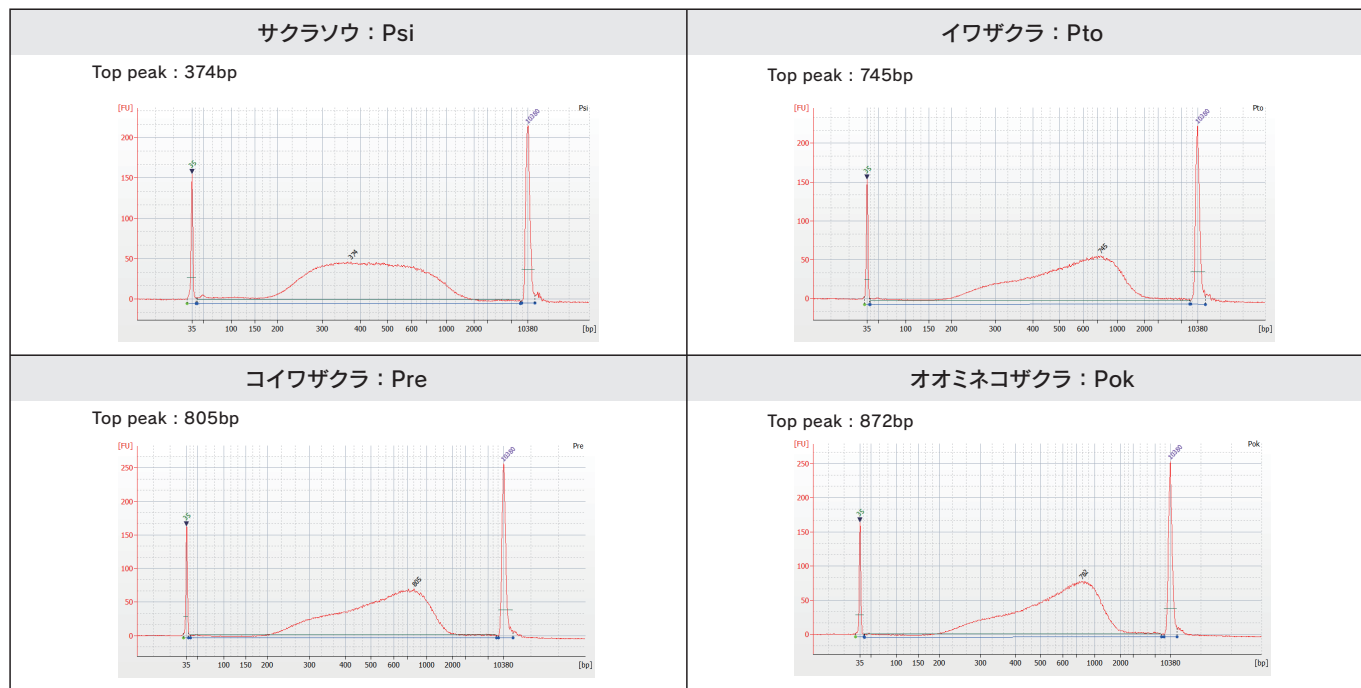
チチブイワザクラの写真



温度37℃、時間7.5minで断片化を行い、ライブラリー増幅後（3cycle）QubitおよびBioanalyzerによりサイズ分布を確認した。
 （※ライブラリー増幅前にサイズセレクションは行わない）

Table 3. Qubit(dsDNA HighSensitivity) により測定したサンプル濃度

サンプル	濃度 [ng/μL]	液量 [μL]
サクラソウ :Psi	16.3	23
イワザクラ :Pto	45.5	23
コイワザクラ :Pre	29.6	23
オオミネコザクラ :Pok	30.1	23

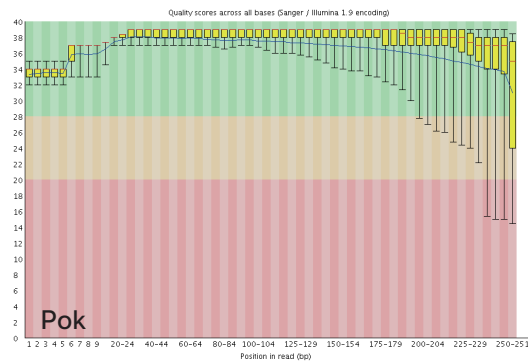
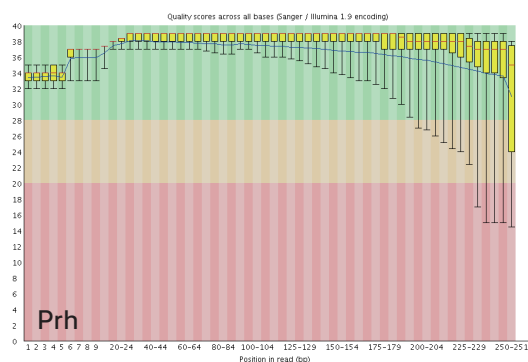
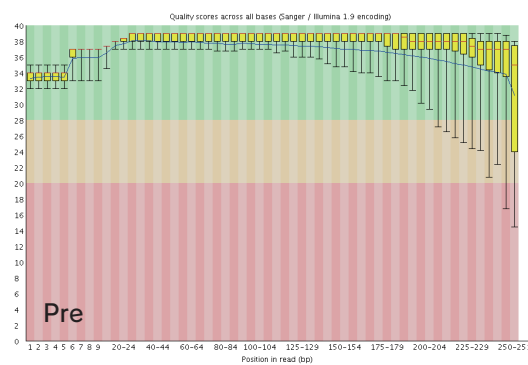
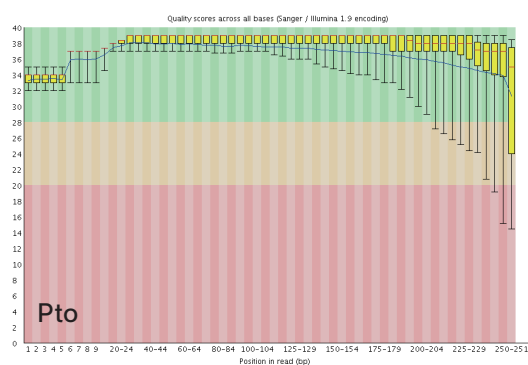


以上の結果により、目的サイズへの断片化が示唆された。
 ただし、Psiに関しては、はじめから分解されていたため、目的サイズには断片化できなかった。

Pto・Pre・Prh・Pokを用いてシーケンスした結果が下記である。

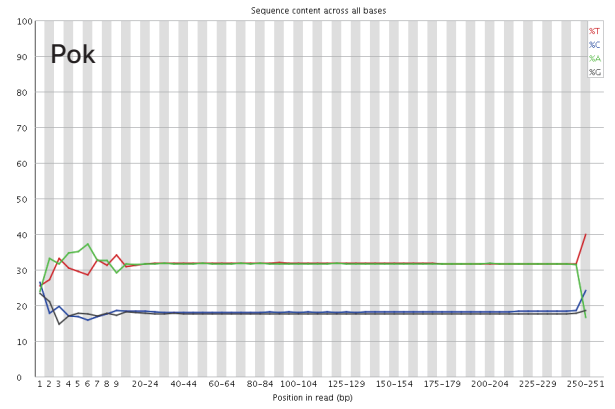
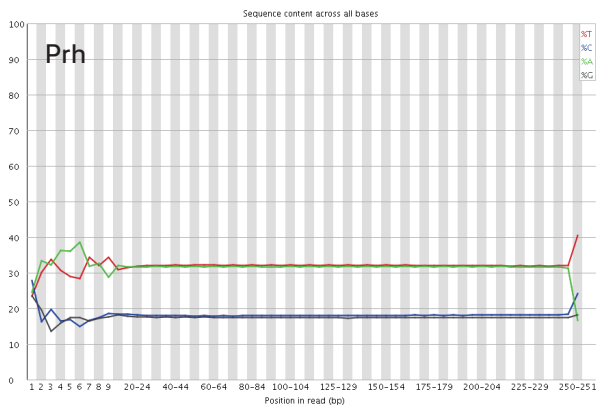
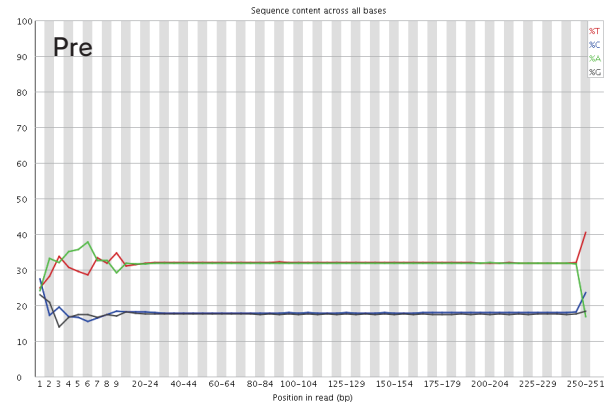
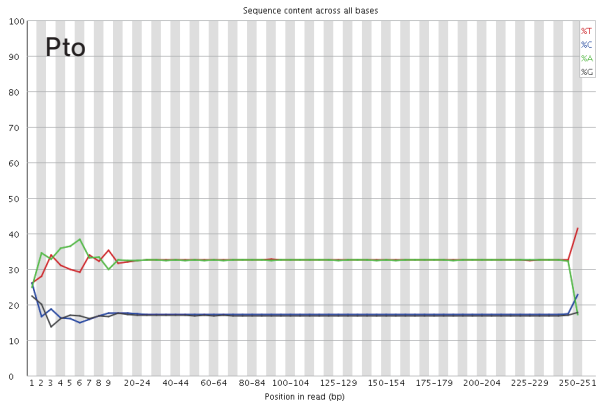
【FAST QC データ】

Per base sequence quality

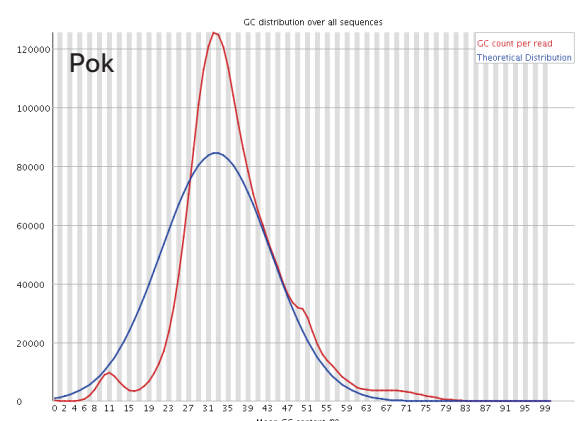
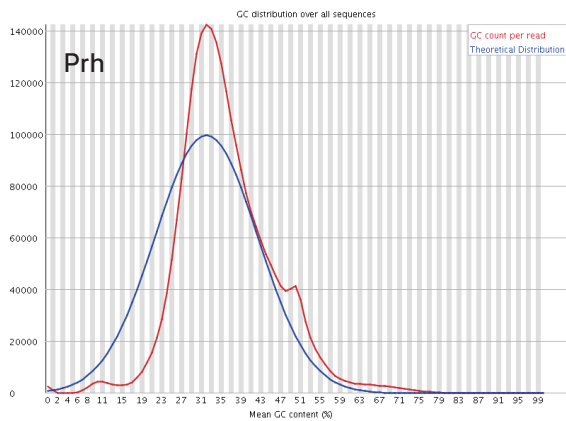
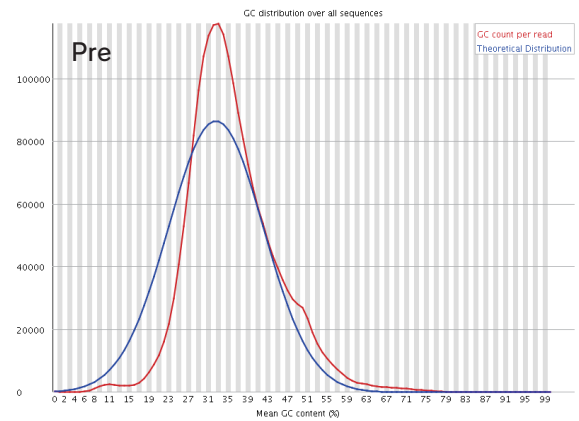
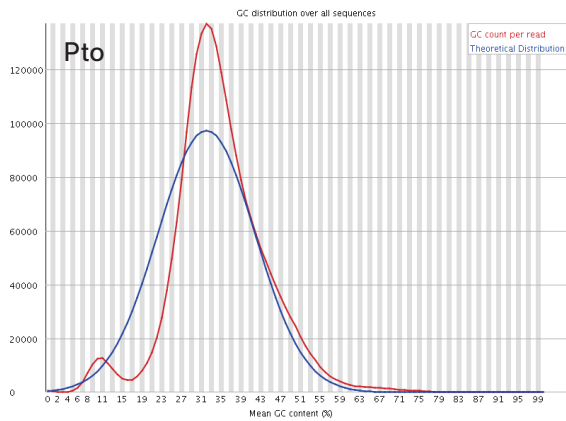




Per base sequence content

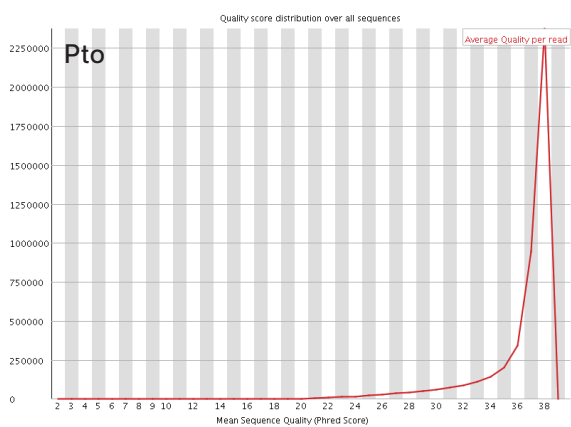


Per sequence GC content

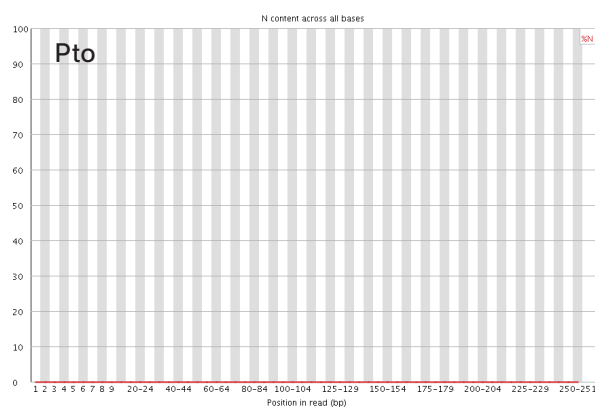


下記にPtoのFASTQCデータを示す。Pre,Prh,Pokも同様の傾向を示した。(no data)

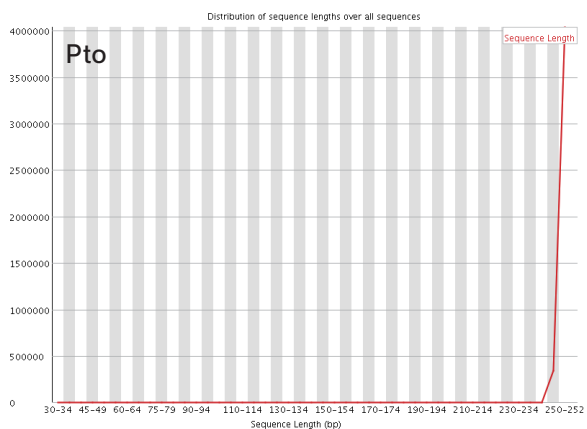
Per sequence quality scores



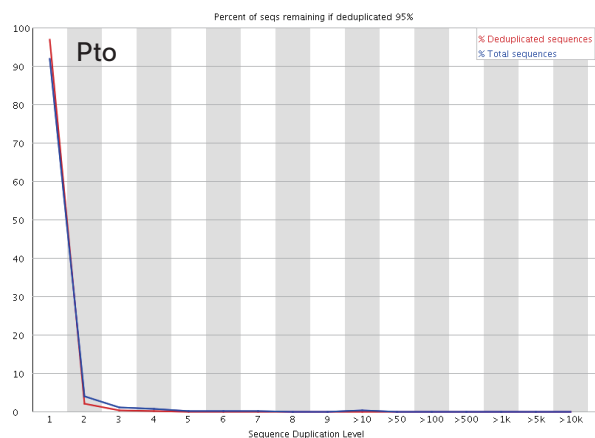
Per base N content



Sequence Length Distribution



Sequence Duplication Levels



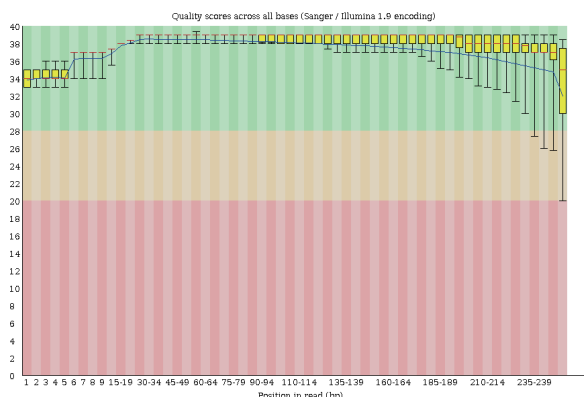
オオネミコザクラの写真



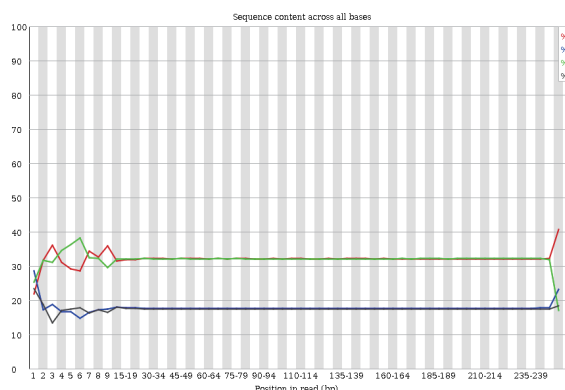
イワザクラの写真

はじめから分解されていたPsiのFASTQCデータは下記である。

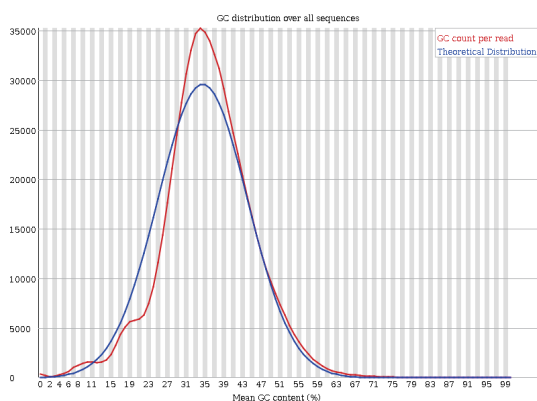
Per base sequence quality



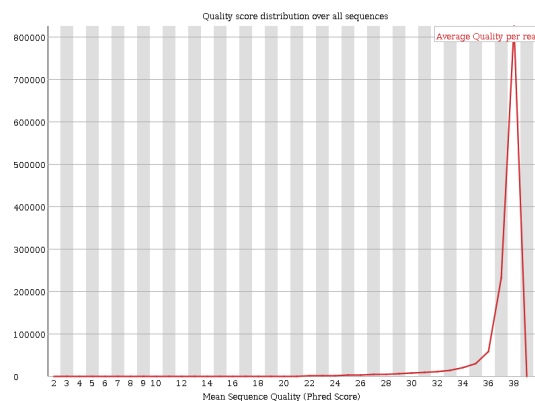
Per base sequence content



Per sequence GC content



Per sequence quality scores



はじめから分解されていたPsiに関しても、解析するのに十分なシーケンスデータを得ることができた。

MiSeq v2 250PE

Final Conc(pM)	Yield Total	Density	Clusters PF (%)	% >= Q30
10pM	9.1	984 +/- 20	94.6 +/- 0.5	85.3

●まとめ

夾雑物を多く含むことが予測される野生植物から、SSR部位予測を行うための十分なシーケンスデータを得ることができた。シーケンスデータをアセンブルした配列から、SSRマーカー候補を抽出したところ、それぞれの種で得られた60個程度マーカー候補から30-40個程度のマーカーが使用可能であった。



お客様のコメント

KAPA HyperPlus Kitはライブラリ作成効率が非常に良く、わずかなDNA量であっても全ゲノムシーケンスが可能であるため、近縁種間で転用可能なSSRマーカーを迅速かつ大量に開発する上で非常に有効な手段であることを実感しました。