



Application

アジレント・テクノロジー社SureSelect XT Target Enrichment Systemを用いた膵臓がん患者由来 cfDNA (5-50ng) からのターゲットシーケンシング

製品名

KAPA Hyper Prep Kit (KK8500, KK8502)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、国立がん研究センター 研究所 がんゲノミクス研究分野 谷内田 真一 様、高井 英里奈 様のご厚意により掲載させていただきました。

本研究成果は、下記の文献にて発表されました。詳細は下記の文献をご参照ください。

【発表論文】

雑誌名： Scientific Reports

タイトル： Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer

著者： Erina Takai, Yasushi Totoki, Hiromi Nakamura, Chigusa Morizane, Satoshi Nara, Natsuko Hama, Masami Suzuki, Eisaku Furukawa, Mamoru Kato, Hideyuki Hayashi, Takashi Kohno, Hideki Ueno, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Hitoshi Nakagama, Tatsuhiro Shibata, Shinichi Yachida

Doi： 10.1038/srep18425

URL： <http://www.nature.com/articles/srep18425>

背景

末梢血サンプルから抽出したcfDNA (Circulating cell-free DNA：血中遊離DNA) の次世代シーケンス解析は、特にがんの分野において、大変重要なアプリケーションとして期待されています。

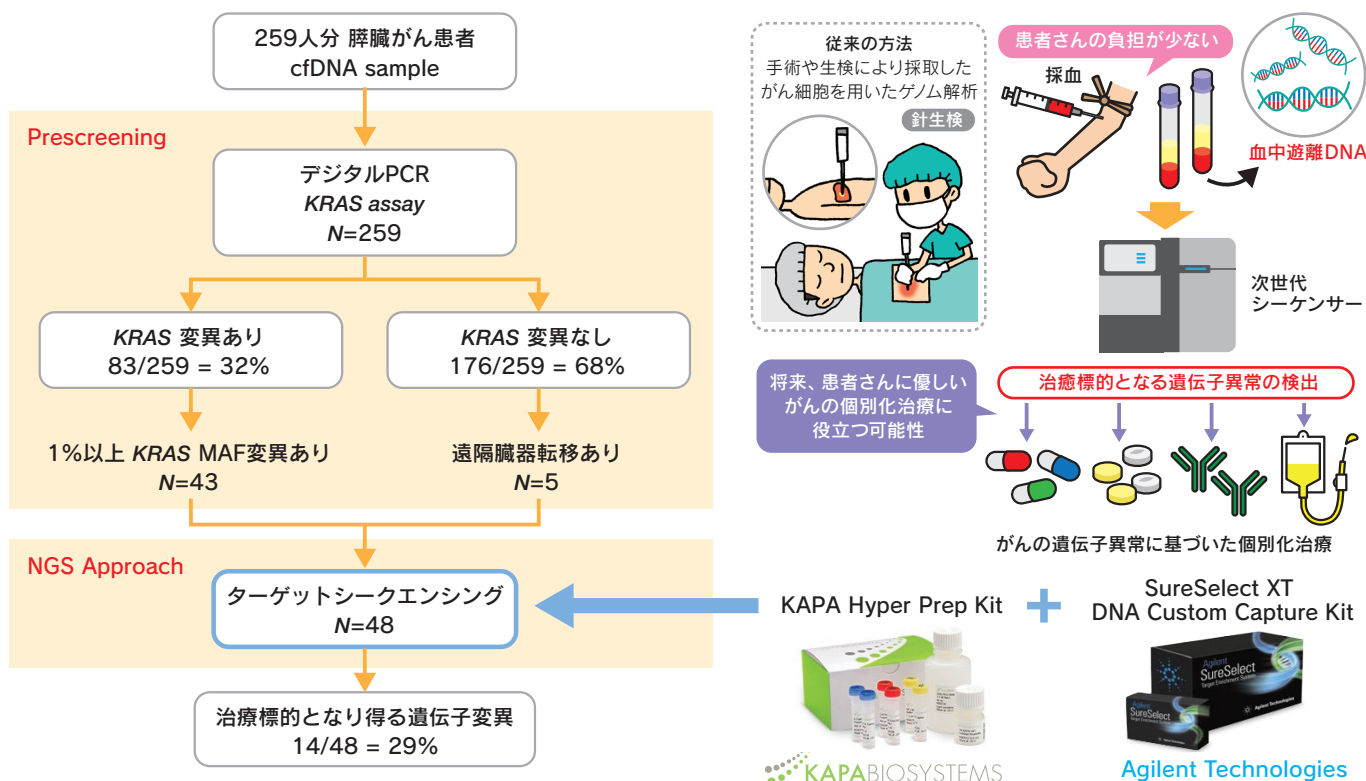
これまでがんのゲノム解析は、生検や手術で採取した組織等を用いて行われてきましたが、生検が困難な患者さんや、薬剤耐性獲得変異など継続的な複数回の検査が必要な場合には患者さんの負担が大きく、また出血などの合併症の危険性も伴います。

そこで、患者さんへの負担が少なく、複数回の検査も可能な血液や体液 (尿など) を用いた網羅的ながんゲノム解析 (いわゆるLiquid biopsy) が、新しいがん分子診断法として期待されています。

しかし、血液検体から得られるcfDNAは少量であり、さらにそのうちがん由来のcfDNAは極めて微量であるため、網羅的なゲノム解析を高精度に行うことはこれまでほとんど実現していませんでした。

ここでは、SureSelect XT Target Enrichment SystemとKAPA Hyper Prep Kitを組み合わせることで、10ng程度のcfDNAからもターゲットシーケンス解析を行うことができたという事例をご紹介します。

血液を用いたがんゲノム解析の手法



KAPA Hyper Prep Kit および SureSelect XT Target Enrichment System (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いたWESライブラリ調製ワークフロー

- ① cfDNA の抽出
- ② qPCR による DNA 定量
- ③ End-repair, dA-tailing
- ④ Adapter-ligation
- ⑤ AMPureXP 精製
- ⑥ ライブラリ増幅(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 XT Target Enrichment System
- ⑪ ライブラリ増幅(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 ライブラリのプール
- ⑮ 次世代シーケンス(illumina HiSeq 2000/2500)

KAPABIOSYSTEMS
KAPA Hyper Prep Kit

KAPA Hyper Prep Kit の特徴

ライブラリーの収量増大とシーケンス・クオリティの向上

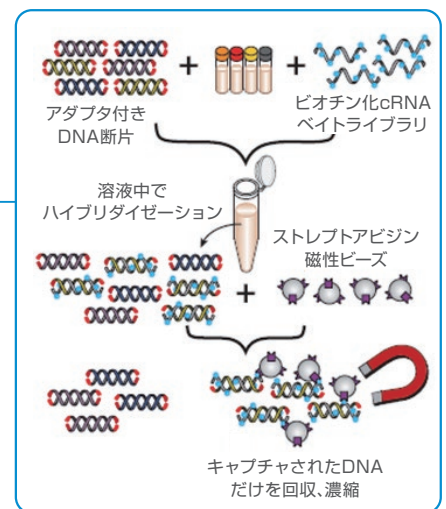
- ライゲーション効率の向上による高いライブラリー収量
- エンジニア酵素 (KAPA HiFi) による低いDuplication Rate と高いカバレッジを実現

ライブラリー作製を3時間以内に!

- エンドリペアとA-テリングの酵素反応を一元化し、SPRI精製なしでアダプターライゲーション反応へ
- One-TubeワークフローによりSPRI精製ステップを最小限に減らし、PCRフリーなら2時間以内、PCR増幅を必要とする場合でも3時間以内のハンズオン・タイムを実現
- 最小限の操作ステップにより、ライブラリー作製の一貫性と再現性を向上



Agilent Technologies
SureSelect XT
DNA Custom Capture Kit



KAPA Hyper Prep Kit および SureSelect XT Target Enrichment System (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いたライブラリの作製

① 血漿cfDNA の抽出

血漿サンプルを4℃, 16,000g, 10min遠心して上清2mLを回収
QIAamp DNA Circulating Nucleic Acid kit(QIAGEN)を使用して、血漿サンプル2mLからDNAを精製
90μLの溶出Bufferで溶出し、4℃で保存

② qPCR によるDNA定量

LINE-1-assay ※Rago, C. *et al.* Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res* **67**, 9364–9370 (2007).

Primer

Forward 5' -TCACTCAAAGCCGCTCAACTAC-3'
Reverse 5' -TCTGCCTTCATTTCTTATGTACC-3'

Reaction condition

94℃ 2 min
94℃ 10 sec
58℃ 15 sec
70℃ 15 sec

} 35 cycles

Reaction components

2x iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA)	10 μL
cfDNA sample	3 μL
Forward primer	X μL (final conc. 0.5 μM)
Reverse primer	Y μL (final conc. 0.5 μM)
DW	Z μL
Total	20 μL

**③ End-repair, dA-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

Input DNA (5-50ng)	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

赤字はSureSelect XT DNA Custom Capture Kitより使用

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

⑤ AMPureXP 精製

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い Clean up を行う

Elution は 10mM Tris-HCl (pH8.0) 20 μ L で行う**⑥ ライブラリ増幅 (キャプチャ前)**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 DNA	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

赤字はSureSelect XT DNA Custom Capture Kitより使用

Thermal Cycler の設定

98 $^{\circ}$ C	45sec	1 cycle
98 $^{\circ}$ C	15sec	7-10 cycles (*)
65 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	5min	1 cycle
4 $^{\circ}$ C	∞	1 cycle

(*) Cycle の基準

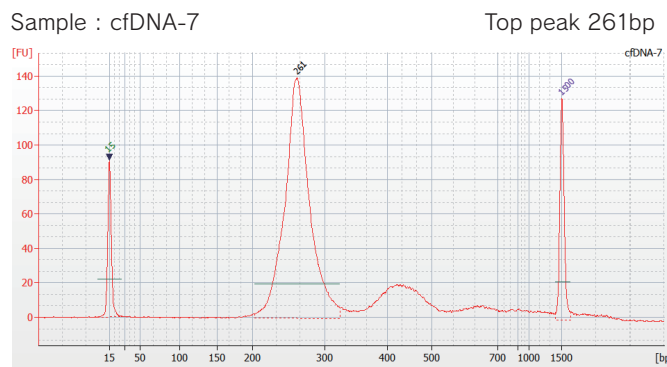
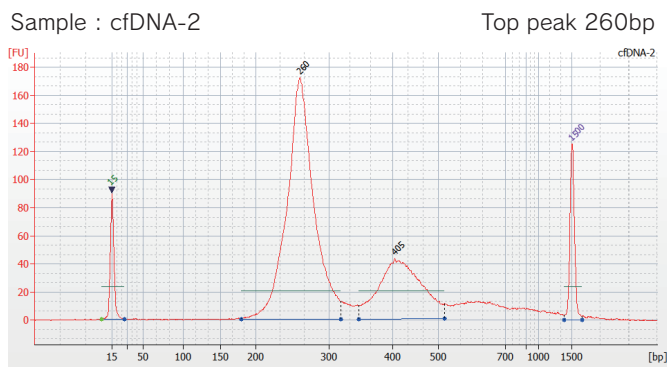
< 10 ng, 10 cycles
 10-20 ng, 9 cycles
 20-30 ng, 8 cycles
 > 30 ng, 7 cycles

⑦ AMPureXP 精製

KAPA Hyper Prep Kit の Protocol に従い Clean up を行う

以降SureSelect XT DNA Custom Capture KitのProtocolに従う**⑧ 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 ライブラリ増幅 (キャプチャ後)****⑫ AMPureXP 精製****⑬ バイオアナライザによるサイズおよび濃度確認****⑭ ライブラリのプール****⑮ 次世代シーケンス (illumina HiSeq 2000)**

ライブラリ増幅後 (キャプチャ前) のBioanalyzer結果



ライブラリの評価

Sample	input DNA ng	Adapter dil	precap-PCR cycle	precap yield ng	Hybridization ng	postcap yield ng
cfDNA-1	31.52	No	7	2125.5	750	171.2
cfDNA-2	50.00	No	7	1265.4	750	271.7
cfDNA-3	16.10	No	8	892.8	750	267.0
cfDNA-4	22.44	No	8	1792.5	750	421.7
cfDNA-5	8.69	No	9	1177.5	750	693.3
cfDNA-6	13.99	No	9	796.5	750	226.9
cfDNA-7	5.78	No	10	866.4	750	222.1
cfDNA-8	5.86	No	10	1406.4	750	308.7

NGS 結果

Sample	input DNA ng	Depth	No of seq	alignment	error (editdistant)	error (mismatch)	duplication	insertsize (average)
cfDNA-1	31.52	1032.20	10,590,354	0.9916	0.0026	0.0025	0.4135	191.41
cfDNA-2	50.00	1819.50	30,186,496	0.9911	0.0027	0.0025	0.5468	199.69
cfDNA-3	16.10	1185.40	40,908,360	0.9876	0.0029	0.0028	0.6064	198.24
cfDNA-4	22.44	1799.30	39,444,920	0.9882	0.0028	0.0026	0.5370	189.16
cfDNA-5	8.69	888.70	32,333,724	0.9894	0.0028	0.0026	0.6124	198.39
cfDNA-6	13.99	746.30	42,373,884	0.9890	0.0027	0.0026	0.7645	193.63
cfDNA-7	5.78	451.10	38,925,422	0.9917	0.0027	0.0026	0.7884	187.99
cfDNA-8	5.86	714.70	35,751,514	0.9907	0.0028	0.0026	0.7270	193.18

●まとめ

SureSelect XT Target Enrichment SystemとKAPA Hyper Prep Kitを組み合わせることで、10ng程度のcfDNAからもillumina社の次世代シーケンシングによるターゲットシーケンシング解析を行うことができた。

がんゲノム解析に主に用いられる凍結組織サンプルの場合と異なり、血漿サンプルから得られるcfDNAは通常数十ngと微量であり、さらに高度に断片化されているため、最低でも200 ngの質の良いDNAを必要とするSureSelect Target Capture systemによるターゲットシーケンシングを行なうことはこれまで極めて困難でした。

KAPA Hyper Prep Kitを用いることにより、断片化されたcfDNAからも効率よくライブラリを構築することができ、少ないinput量でも10サイクル以下のPCRでキャプチャに十分な量のライブラリが得られたことには驚きました。

今回のSureSelectカスタムパネルのようにターゲット遺伝子を限定することで低コストでdeep sequencingを行なうことも可能であり(今回の検討では平均で1000x以上)、cfDNA中に低頻度に存在するがん由来DNAの変異も検出できると考えられます。



お客様のコメント