



Application

C1システム・Bravo・KAPA HyperPlus Kitを用いた 全自動single cell DNA ライブラリの作製

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、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 生命システム観測分野 関真秀 様、鈴木穂 教授のご厚意により掲載させていただきました。

本アプリケーションノートは、アジレント・テクノロジー株式会社、フリューダ임株式会社と協力の元、編集いたしました。

背景

多くの局面で、解析対象となる組織は不均一な細胞集団により構成される。多様な細胞群が織りなす複雑な3次元細胞社会であり、どの細胞をとってもひとつとして相互に等価な細胞はない。特にがん細胞では、そのゲノムは染色体不安定性に起因するいわゆるがん進化を繰り返している。薬剤耐性、単位能の獲得の発生源地となると考えられているこれらの少数細胞を対象としたシングルセルゲノム解析が始まっている。以下の機器と試薬を組み合わせることによって行った、肺腺がん細胞のシングルセルエキソーム解析を例解する。

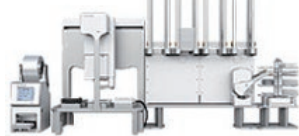
- C1システム (FLUIDIGM®) ; シングルセル遺伝子解析のための自動サンプル調整システム
- Bravo (Agilent Technologies) ; ライブラリ調製の自動化とハイスループット化へのツール
- KAPA HyperPlus Kit (Kapa Biosystems) ; 断片化装置が必要ないため、自動化に適し、微量からのライブラリ作製キット

実験に用いた機器・試薬

single cell DNA & RNA ライブラリの自動化



Agilent Technologies
Bravo



Sequencing



© Agilent Technologies, Inc. 2016
Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.



KAPABIOSYSTEMS

KAPA HyperPlus Kit
Cat.No. KK8510 8回用
Cat.No. KK8512 24回用
Cat.No. KK8514 96回用



Agilent Technologies

SureSelect XT2
Human All Exon V6
plus COSMIC

© Agilent Technologies, Inc. 2016
Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

KAPABIOSYSTEMS
日本ジェネティクス株式会社

KAPA HyperPlus Kit

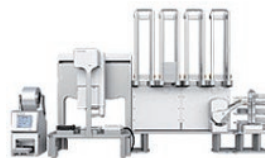


Agilent Technologies
SureSelect XT2



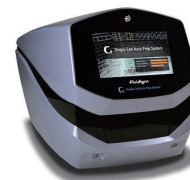
© Agilent Technologies, Inc. 2016
Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

Agilent Technologies
Bravo



© Agilent Technologies, Inc. 2016
Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc.

FLUIDIGM®
C1 system

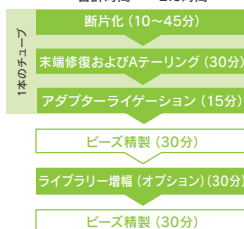


KAPA HyperPlus Kitの特徴

- 断片化装置フリー
- 約2.5時間での "DNA断片化とライブラリー調製"
- 1 ng ~ 1 μgで自在のDNAサンプルインプット量
- 限界まで減らしたビーズ精製ステップ
- PCRフリーのワークフローが可能に
- 増幅バイアスの低減でシーケンスカバー率を向上
- 自動化に最適

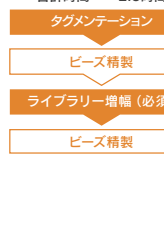
KAPA HyperPlus Kit

合計時間：～2.5時間



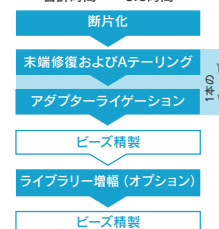
I社 キットN

合計時間：～2.5時間



C社 超音波破砕機 + KAPA Hyper Prep

合計時間：～3.5時間



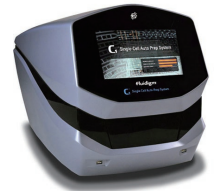
方法

- ① Fluidigm C1 system を用いて Single cell から DNA サンプルを単離
- ② Agilent TapeStation による濃度測定 (High sensitivity)
- ③ KAPA Frag 酵素による断片化
- ④ End-repair, dA-tailing
- ⑤ Adapter-ligation
- ⑥ AMPureXP 精製
- ⑦ ライブラリ増幅(キャプチャ前)
- ⑧ AMPureXP 精製
- ⑨ Agilent TapeStation によるサイズ分布チェックおよび濃度確認
- ⑩ Pre Capture PCR Product の濃縮
- ⑪ SureSelect Library Capture
- ⑫ ライブラリ増幅(キャプチャ後)
- ⑬ AMPureXP 精製
- ⑭ Agilent TapeStation によるサイズおよび濃度確認
- ⑮ ライブラリのプール
- ⑯ 次世代シーケンス(illumina HiSeq 2000/2500)

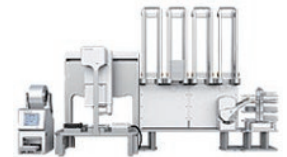
KAPA BIOSYSTEMS
KAPA HyperPlus Kit

Agilent Technologies
SureSelectXT2
Human All Exon V6 plus COSMIC

FLUIDIGM®
C1 system



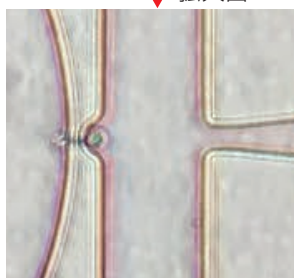
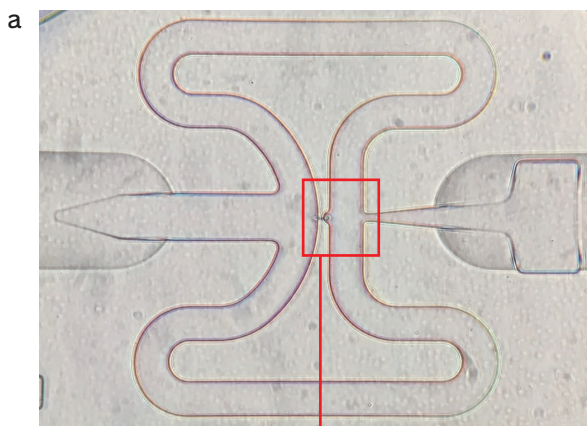
Agilent Technologies
Bravo



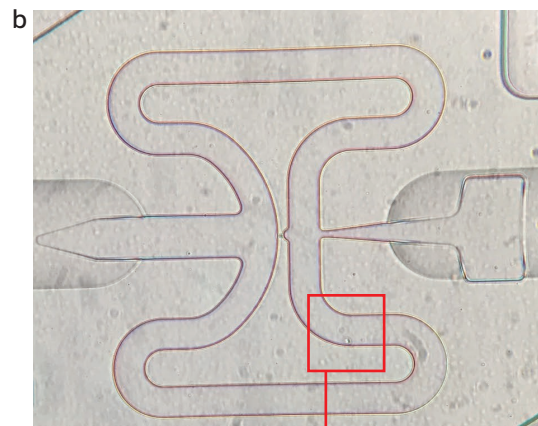
© Agilent Technologies, Inc. 2016
Reproduced with Permission, Courtesy
of Agilent Technologies, Inc.

結果

C1 system のキャプチャーサイトにキャプチャーされたシングルセルの例



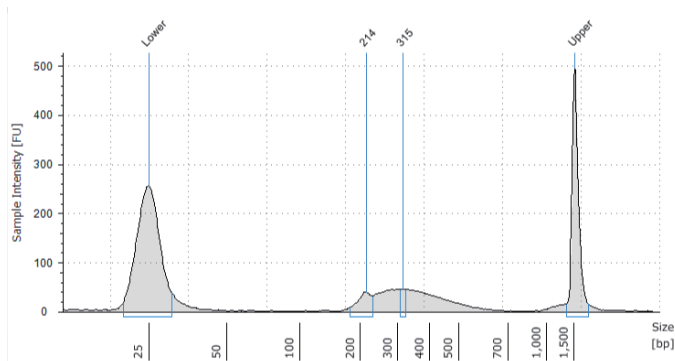
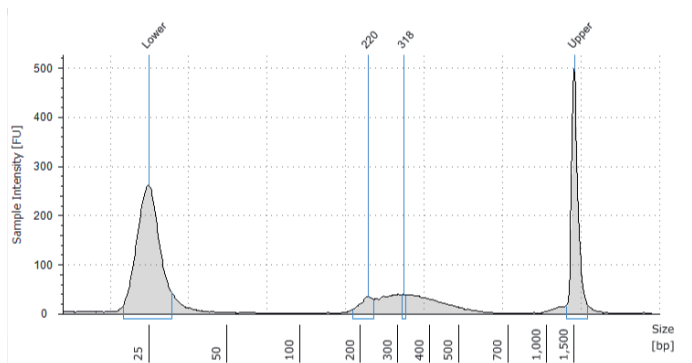
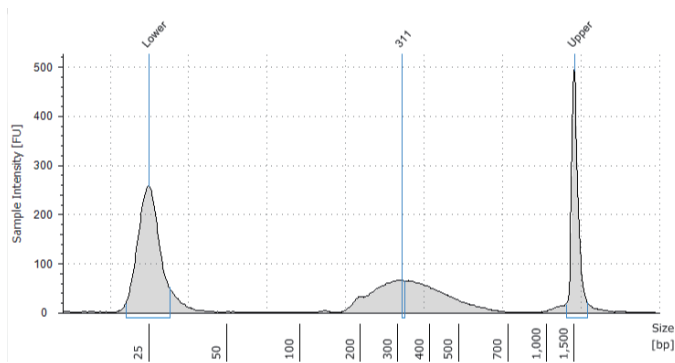
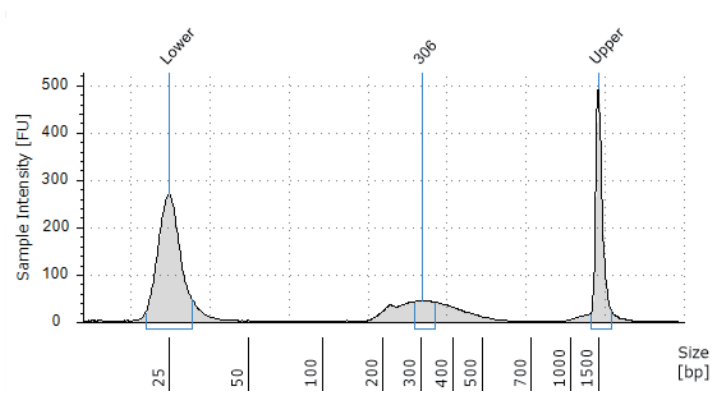
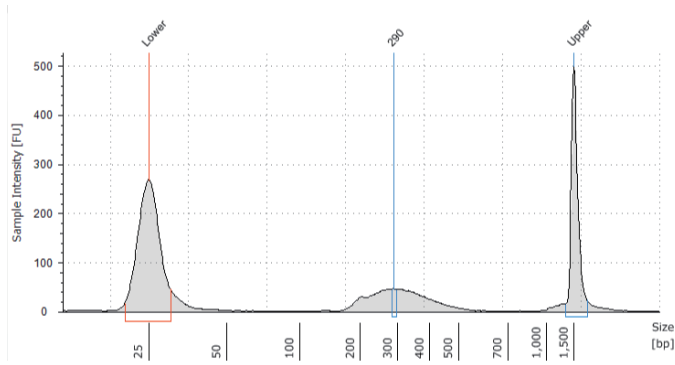
キャプチャーサイトにキャプチャーされたシングルセルの例



バタフライ型の流路中にあるシングルセルの例
キャプチャーサイトに細胞がなくても、バタフライ型の
流路中にシングルセルがあればゲノム増幅が行われる。

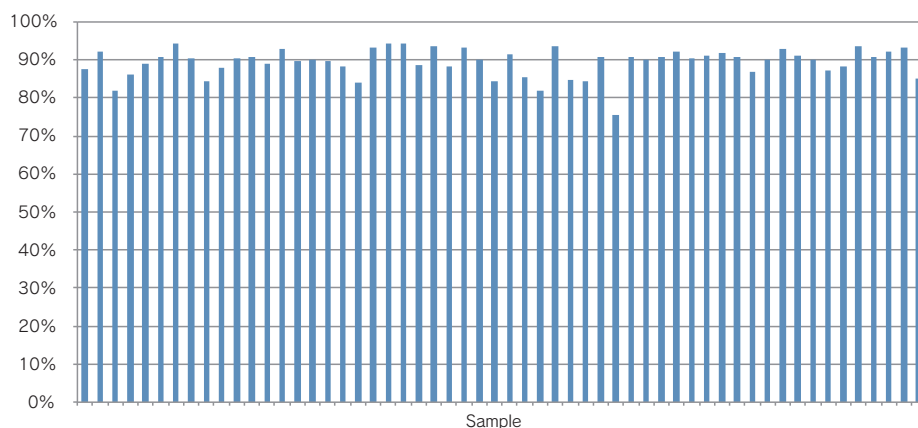
Single-cell capture by C1.

ライブラリ作製後の TapeStation によるサイズおよび濃度確認の結果の事例



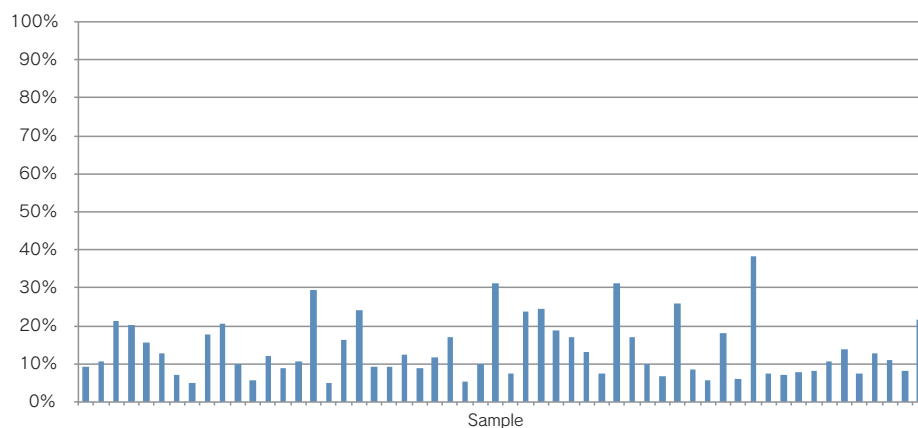
KAPA HyperPlus断片化酵素により、目的サイズへの断片化が示唆され、どのサンプル由来のライブラリも300bp程度にピークが得られた。ピークの立ち上がりbp-1000bpまでの濃度を参考として、HiSeqに持ち込む際の濃度の参考とした。

56サンプルのmapping rate



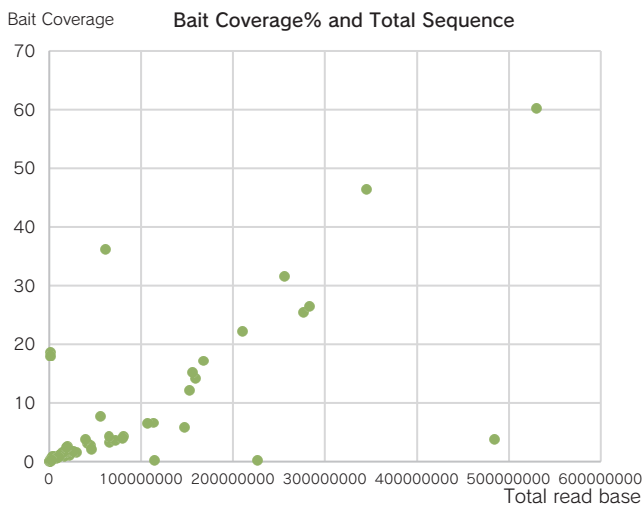
どのサンプルにおいても70%以上のmapping rateを示した。

56サンプルのduplication rate

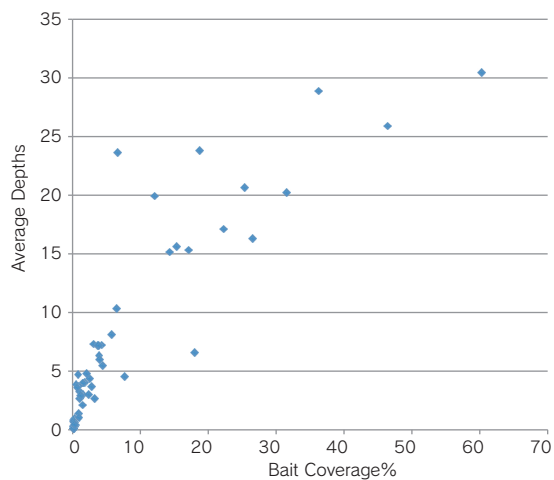


duplication rateの平均値は14%程度を示した。SD値も0.077であり、値のばらつきも小さかった。

Bait Coverage – Read Count



56サンプルのBait coverage% vs Average Depths



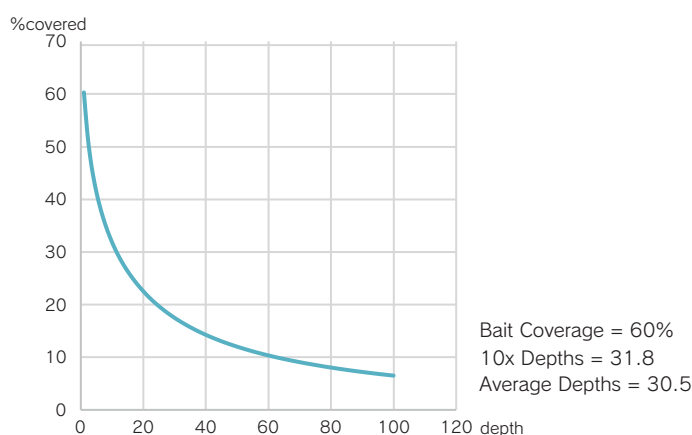
細胞などに問題があって増幅がうまくいかない場合があり、その場合、そのウェルの細胞はよく読めていない。
通常Exome-Seqでは、50-150くらいを基準にすることが多いが、Single cellだとバイアスがあるので、x30くらいでも問題ないと思う。

シングルセル解析の実例

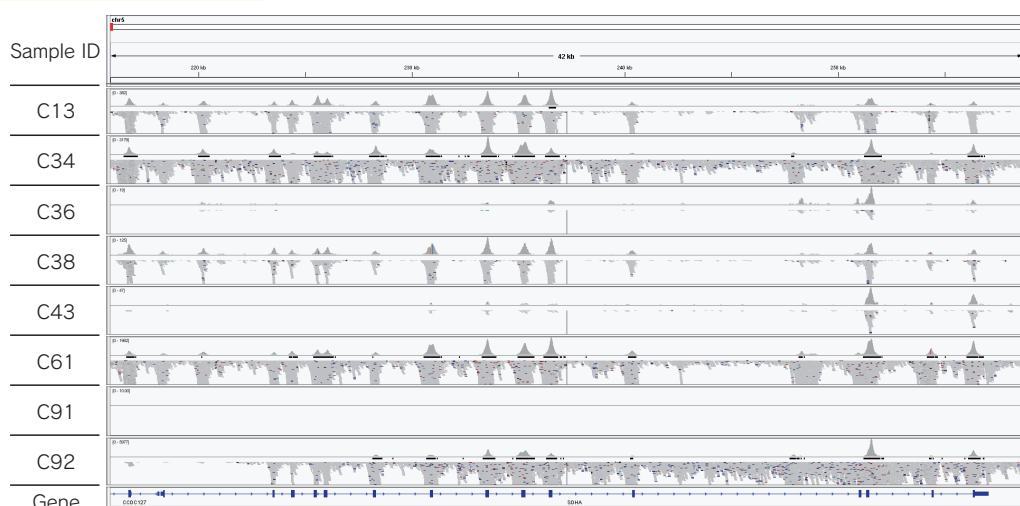
56 サンプル中のうち、Bait Coverage% の高いベスト10

Sample ID	number of reads	number of mapped reads	mapping rate	duplication rate	Bait Coverage%	Average Depths	10x in Cover%
C43	18,093,262	16,888,688	93%	5%	60.29	30.49	31.83
C91	4,659,146	4,237,878	91%	13%	46.41	25.90	19.98
C13	27,716,951	26,174,821	94%	7%	36.25	28.88	20.84
C92	13,245,844	12,224,664	92%	11%	31.52	20.20	15.09
C38	17,150,595	16,080,511	94%	12%	26.50	16.32	13.54
C36	21,128,194	19,929,880	94%	12%	25.38	20.63	13.62
C34	12,662,781	11,801,315	93%	9%	22.19	17.13	11.83
C61	27,975,272	26,162,070	94%	19%	18.69	23.79	10.24
C80	2,544,213	2,212,553	87%	38%	18.00	6.58	6.77
C02	10,348,694	9,536,062	92%	11%	17.15	15.34	9.20

Bait coverage% の値が1番高かった
Sample ID C43 の Depth- % coverage



SDHA gene の SNP Call 事例



●まとめ

C1 systemとBravoとKAPA HyperPlus kitを用いることによって、肺腺がん培養細胞株から効率よくゲノムを抽出、エキソーム解析を行うことが可能であった。
十分なシークエンス精度でデータを取得し、シングルセルのがんゲノム変異を同定することが可能となったと考えている。



お客様のコメント

KAPA HyperPlus kitはヒトの多くの疾患を対象とした全ゲノム解析あるいはエキソーム解析で、最も頻繁に用いられているライブラリ調製キットである。
今回のシングルセルエキソーム解析にも、微量からのライブラリ調製、という点で非常に優秀な性能を明らかにしたと考えている。

本資料掲載の製品は全て研究用です。その他の用途にご利用いただくことはできません。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2016. AUG