



Application

KAPA HyperPlus Kitを用いた腸内細菌叢の全ゲノムショットガンシーケンス解析

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

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、東京大学医科学研究所 システム免疫学社会連携研究部門 佐藤 毅史 先生、木村 恭将 先生のご厚意により掲載させていただきました。

背景

近年の研究から、腸内細菌は私達の体の健康と密接に関わっていることが明らかになり、さまざまな疾患における腸内細菌叢解析が世界中で行われています。一般的な細菌叢解析手法として16S rRNAの配列を解析する16S rRNAアンプリコンシーケンスが汎用されていますが、詳細な菌の分類や遺伝子構成を明らかにするために全ゲノムショットガンシーケンス法を用いた解析も行われ始めています。本アプリケーションノートでは、サーマルサイクラー 1台で一連のライブラリー調製が可能なKAPA HyperPlus Kitを用いた腸内細菌叢の全ゲノムショットガンシーケンス解析手法をご紹介します。

KAPA HyperPlus Kitを用いた全ゲノムショットガンライブラリー調製ワークフロー

- ① 糞便サンプルからのDNAの抽出
- ↓
- ② Quantus (Promega 社) によるDNAの定量
- ↓
- ③ アガロースゲル電気泳動によるDNAの品質確認
- ↓
- ④ KAPA Frag 酵素による断片化
- ↓
- ⑤ End-repaire, A-Tailing
- ↓
- ⑥ Adapter-ligation
- ↓
- ⑦ Adapter-digestion
- ↓
- ⑧ Post-ligation clean up (AMPureXP 精製)
- ↓
- ⑨ Size selection 1st (AMPureXP 精製)
- ↓
- ⑩ Size selection 2nd (AMPureXP 精製)
- ↓
- ⑪ Barcode addition and amplification
- ↓
- ⑫ Post-amplification clean up (AMPureXP 精製)
- ↓
- ⑬ 次世代シーケンス (illumina MiSeq)

詳細プロトコルは、P3に記載

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"
- ◆ 1ng ~ 1μg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



使用した Thermal Cycler

品名: LifeECO
型番: TC-96GHbC
Heat Lid の温度設定やオン/オフが可能

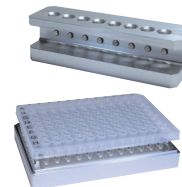


品名: NGS MagnaStand (YS-Model) 8Ch×0.2ml PCRチューブ用
型番: FG-SSMAG2

品名: NGS MagnaStand 8Ch×1.5mlチューブ用
型番: FG-SSMAG1.5

品名: NGS MagnaStand (YS-Model) 96wellプレート用
型番: FG-SSMAG96 FG-SSMAG96SLV(微量対応モデル)

次世代シーケンス (NGS) 用ライブラリー調製では、AMPure XPビーズを用いたサンプルクリーンアップの工程が何回かあります。従来のマグネットスタンドは磁力が弱いため、ピベッティングでの溶液ミックスや、溶液回収の際のビーズキャリアオーバーが問題でした。このマグネットスタンドは、NGSライブラリー調製に特別に開発されており、AMPure XPのハンドリングをストレスなく行うことができます。



実験条件

● サンプルDNA

ゲノムDNA抽出方法: 詳細は、P3に記載

DNAを抽出したサンプルの種類: マウス糞便

精製したゲノムDNAの定量方法: Promega Quantus

ライブラリー作製前のDNAの状態、品質確認: アガロースゲル電気泳動

ライブラリーに持ち込むDNA (Input DNA) の懸濁バッファー組成: 10mM Tris-HCl (pH8.0)

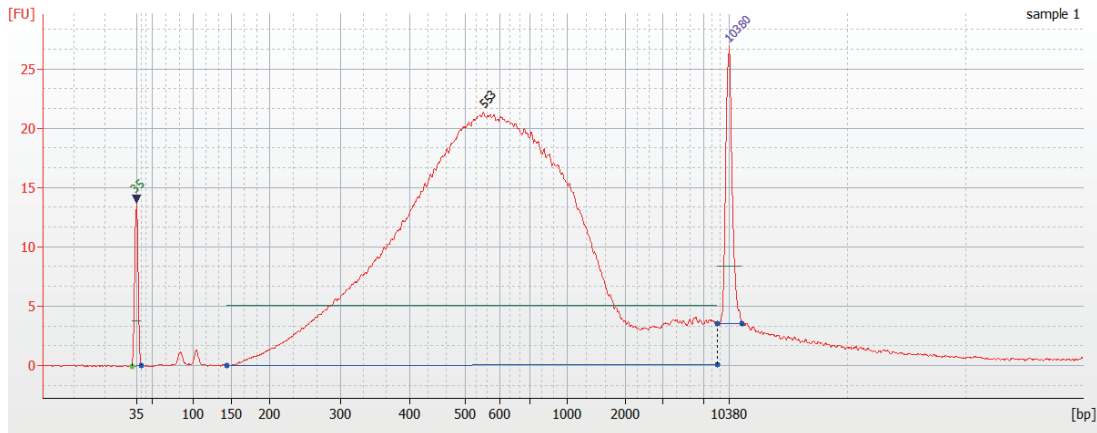
ライブラリーに持ち込むDNA (Input DNA) 量: 200ng



東京大学医科学研究所システム免疫学社会連携研究部門では、腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い、腸内細菌と疾患、宿主免疫系の関わりについての研究を進めています。

ライブラリ増幅後のBioanalyzer結果

Top peak 553bp



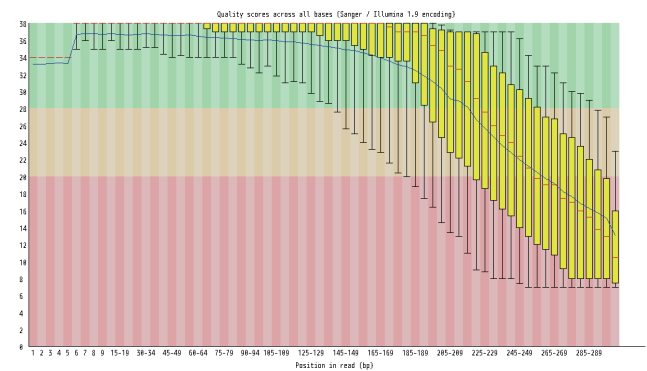
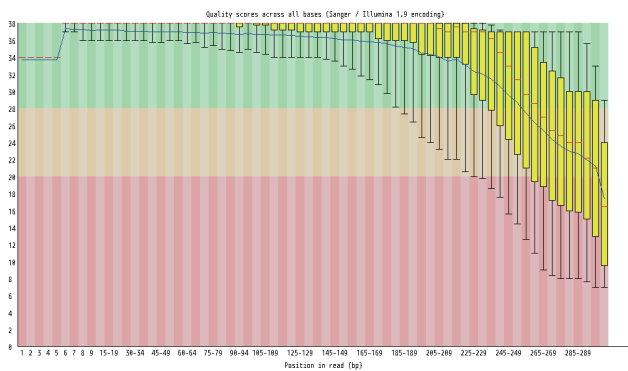
- 断片化条件
- 温度：37℃
- 時間：7min
- Target size：500bp

目的サイズへの断片化が示唆された。

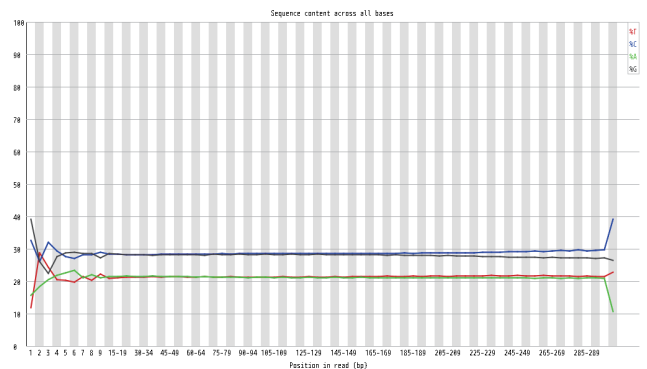
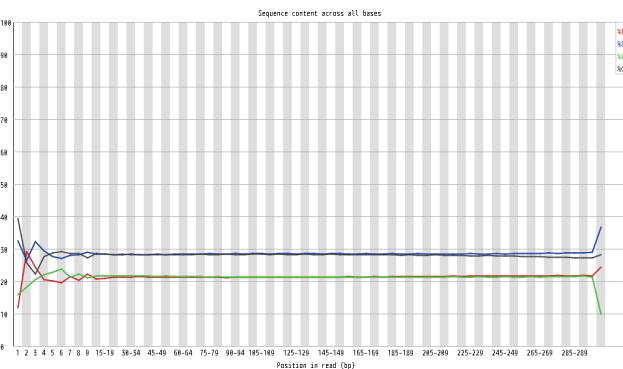
ライブラリの評価

FASTQCデータ

Per base sequence quality



Per base sequence content



腸内細菌叢解析の実験の始めるときにDNAの断片化用の機器が手元になかったため、酵素で断片化処理が可能なKAPA HyperPlus Kitを選択しました。

KAPA HyperPlus Kitは、サーマルサイクラー上で多検体のライブラリーを同時に調製でき、8連チューブまたは96穴PCRプレート対応のマグネットを使用することにより、効率的なライブラリー調製を行うことができました。また、以前に、他社断片化酵素を用いてライブラリーを作製した際には、読み始めの配列に偏りが生じ、十分な解析結果が得られませんでした。KAPA HyperPlus Kitを用いることにより、解析に十分な結果を得ることができました。



お客様のコメント

[補足資料：詳細プロトコル]

KAPA HyperPlus Kitを用いた全ゲノムショットガンライブラリ作製ワークフロー

① 糞便サンプルからのDNAの抽出

※ Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. Kim SW *et al.*, DNA Research, 20, 241-253 (2013)

- 1) 糞便サンプルのペレットを 15mg/mL リゾチーム (Sigma-Aldrich CO., LCC) で懸濁し、37°Cで 1hr インキュベート
- 2) 精製されたアクロモペプチダーゼ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) を終濃度 2000unit/mL になるように加え、37°Cで 1hr インキュベート
- 3) 懸濁液を 1% (wt/vol) ラウリル硫酸ナトリウムと 1mg/mL protenaseK (Merck Japan) を加えて、55°Cで 1hr インキュベート
- 4) 溶解液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (LifeTechnologies Japan, Ltd) で処理
- 5) エタノールを加え、4°C、3,000gで 15min 遠心
- 6) DNAのペレットを 75% エタノールでリンス
- 7) 上清を取り除き、乾燥
- 8) TE溶液に再溶解
- 9) 1mg/mL RNaseA溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) を用いて 37°Cで 30min インキュベート
- 10) 20% ポリエチレングリコール溶液 (PEG6000-2.5M NaCl) を等量加え沈澱させる
- 11) 4°C、8,060gで遠心
- 12) 75% エタノールでリンス
- 13) 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液に再溶解

② Quantus (Promega 社) によるDNAの定量

③ アガロースゲル電気泳動によるDNAの品質確認

④ KAPA Frag 酵素による断片化

● 反応液の組成

Input DNA (200ng)	7 μ L
End Repair & A-Tailing Buffer	1 μ L (*)
End Repair & A-Tailing Enzyme	2 μ L (*)
Total Volume per well	10 μ L

* マスターミックスを調製し、3 μ L ずつ加える

反応後すぐに氷上のアルミブロックへ、4°Cでの数時間の保存は可

● Thermal Cycler の設定
(Target size : 500bp)

4°C	1min	} 1cycle
37°C	7min	
4°C	∞	

ポイント!

Thermal Cyclerの Heat Lid はオフに設定します

⑤ End-repaire, A-Tailing

● 反応液の組成

Fragmentation reaction mix	10 μ L
End Repaire & A-Tailing Buffer	1.4 μ L
End Repaire & A-Tailing Enzyme mix	0.6 μ L
Total	12 μ L

すぐに次のステップに進む場合は氷上のアルミブロックへ、4°Cでの数時間の保存は可

● Thermal Cycler の設定

65°C	30min	} 1cycle
4°C	∞	

ポイント!

Thermal Cyclerの Heat Lid は85°Cに設定します

⑥ Adapter-ligation

● 反応液の組成

End Repaire & A-Tailing reaction product	12 μ L
Adaptor	0.5 μ L
Water	1.5 μ L (*)
Ligation Buffer	6 μ L (*)
DNA Ligase	2 μ L (*)
Total	22 μ L

* Adapterをそれぞれチューブに先に加えた後、マスターミックスを9.5 μ L ずつ加える

次の日まで保存する場合は 4°C 保存

● Thermal Cycler の設定

20°C	15min-4hr	} 1cycle
4°C	∞	

⑦ Adapter-digestion

● 反応液の組成

Ligation product	22 μ L
他社 enzyme	0.6 μ L
Total	22.6 μ L

● Thermal Cycler の設定

65°C	30min	} 1cycle
4°C	∞	

⑧ Post-ligation clean up (AMPureXP 精製)

Agencourt® AMPure® XP beads を加える

● 反応液の組成

Adapter ligation reaction product	22.6 μ L
Agencourt® AMPure® XP	18.08 μ L
Total	40.68 μ L

- 1) ピペッティングによる混合
- 2) 室温で5-15min 静置
- 3) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 4) 上清を除去
- 5) マグネット上で用事調製した80%のエタノールを100 μ L加える
- 6) 30sec 静置
- 7) エタノールを除去
- 8) 洗浄ステップを繰り返す
- 9) スピンドウン
- 10) 残留エタノールを全て除去
- 11) ビーズを3-5min 乾燥
- 12) マグネットからチューブを取り除く
- 13) 30 μ Lの10mM Tris(pH8.0)を加える
- 14) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 15) 上清を新しいチューブに移す

⑨ Size selection 1st (AMPureXP 精製) (Target size : 400-600bp)

Agencourt® AMPure® XP beads を加える

● 反応液の組成

Agencourt® AMPure® XP beads	30 μ L
Agencourt® AMPure® XP reagent	12 μ L
Total	42 μ L

- 1) ピペッティングによる混合
- 2) 室温で5-15min 静置
- 3) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 4) 上清を新しいチューブに移す

⑩ Size selection 2nd (Agencourt® AMPure® XP 精製) (Target size : 400-600bp)

- 1) Agencourt® AMPure® XP beads を6 μ L加える
- 2) ピペッティングによる混合
- 3) 室温で5-15min 静置
- 4) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 5) 上清を除去
- 6) マグネット上で用事調製した80%のエタノールを100 μ L加える
- 7) 30sec 静置
- 8) エタノールを除去
- 9) 洗浄ステップを繰り返す
- 10) スピンドウン
- 11) 残留エタノールを全て除去
- 12) ビーズを3-5min 乾燥
- 13) マグネットからチューブを取り除く
- 14) 30 μ Lの10mM Tris(pH8.0)を加える
- 15) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 16) ピペッティングによりビーズを再懸濁する
- 17) 上清を新しいチューブに移す



⑪ Barcode addition and amplification

● 反応液の組成

Size selected DNA	3 μ L
Universal primer	1 μ L
Each barcode primer	1 μ L
2xKAPA HiFi HotStart ReadyMix	5 μ L
Total	10 μ L

● Thermal Cycler の設定

98°C	45sec	} Cycle number:5-10 (depend on the samples)
98°C	15sec	
60°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	1min	
12°C	∞	

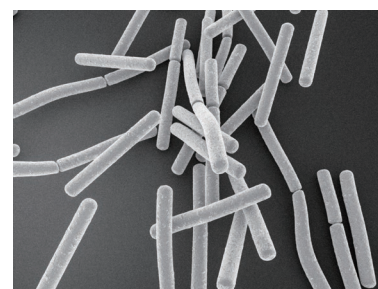
⑫ Post-amplification clean up (AMPureXP精製)

Agencourt® AMPure® XP beads を加える

● 反応液の組成

DNA library	10 μ L
Agencourt® AMPure® XP reagent	10 μ L
Total	20 μ L

- 1) ピペッティングによる混合
- 2) 室温で5-15min 静置
- 3) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 4) 上清を除去
- 5) マグネット上で用事調製した80%のエタノールを100uL加える
- 6) 30sec 静置
- 7) エタノールを除去
- 8) 洗浄ステップを繰り返す
- 9) スピンドアウン
- 10) 残留エタノールを全て除去
- 11) ビーズを3-5min 乾燥
- 12) マグネットからチューブを取り除く
- 13) 20uLの10mM Tris(pH8.0)を加える
- 14) チューブをマグネットに置き、溶液がクリアになるまで静置
- 15) 上清を新しいチューブに移す



システム免疫学社会連携研究部門は東京大学医科学研究所と株式会社医学生物学研究所の共同研究契約によって2014年9月に開設されました。当研究部門では

- ・バイオインフォマティクスによる免疫現象の解明と免疫疾患の治療法の開発
- ・免疫研究 (wet) とバイオインフォマティクス (dry) の両分野を専門とする人材の育成を目指しています。