



Application

# KAPA HyperPlusキット改変プロトコルを用いた微量RNA (50pg)・シングルセル相当RNAからのライブラリ作製

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、早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構 細川 正人 先生のご厚意により掲載させていただきました。

## 概要

多量サンプルを扱うRNA-seq実験において、ライブラリ作製にかかるコストは大きく、実験規模を制約することにつながる。多くのキットでは、推奨量として1ng以上のインプットcDNAが必要とされている。ところが、シングルセルRNA由来のcDNAなどでは、cDNA収量がわずかであり、貴重なサンプル消費が懸念材料となる。コスト面とインプット量制限の課題を解消するため、1細胞用のRNA-seq(増幅cDNA)ライブラリ作製プロトコルであるSMART-seq2とKAPA HyperPlus Kitを組み合わせた改変ライブラリ作製方法を検討し、他社製品と比較した。

## 実験条件と実験手順

細胞から抽出した50pgのtotal RNAを用い、SMART-seq2 (Nature Protocols 9,171-181 (2014)) の手法によりcDNAを調製した。それを用い、インプットcDNA量やLigationおよびAmplificationの反応液量を改変した、いくつかの条件でライブラリー調製を行った。

- 生物種： ヒトがん細胞株
- 初発サンプル量： total RNA 50pg
- RNA抽出方法： RNeasy mini kit (Qiagen社) DNase I処理実施
- cDNA調製： SMART-seq2 (Nature Protocols 9,171-181 (2014))
- ライブラリ調製： KAPA HyperPlus Kit (ライゲーションベース)  
I社キットN (タグメンテーションベース)
- シーケンサー： Miseq

### KAPA HyperPlus 反応条件

サンプルID	プロトコール	インプットcDNA			アダプター (nM)	グループ	
		濃度 (ng/uL)	液量 (uL)	cDNA量 (ng)			
S01	スタンダード (推奨法)	0.2	5	1	300	K1	
S02							
S03							
S04	L15_A12	0.2	1	0.2	1500	K2	
S05							
S06							
S07		1	1	1	1500	K3	
S08							
S09							
S10		0.2	1	0.2	15000	K4	
S11							
S12							
S13		1	1	1	15000	K5	
S14							
S15							
S16		L15_A15	0.2	1	0.2	1500	K6
S17							
S18							
S19	1		1	1	1500	K7	
S20							
S21							

### I社キットN 反応条件

サンプルID	インプットcDNA (ng)	反応液量	グループ
N.S01	1 (推奨法)	1x	N1
N.S02			
N.S03			
N.S04	0.25	0.25x	N2
N.S05			
N.S06			
N.S07	0.5		N3
N.S08			
N.S09			
N.S10	1	N4	
N.S11			
N.S12			

### \*反応条件検討ポイント\*

#### KAPA HyperPlus kit

Input DNA量：0.2ng 1.0ng  
 反応液量：L15\_A12：Ligation 1/5量 Amplification 1/2量で反応  
 L15\_A15：Ligation 1/5量 Amplification 1/5量で反応  
 増幅サイクル数：全条件15サイクル

#### I社キットN

Input DNA量：0.25ng 0.5ng 1.0ng  
 反応容量：1/4量で反応  
 増幅サイクル数：全条件12サイクル

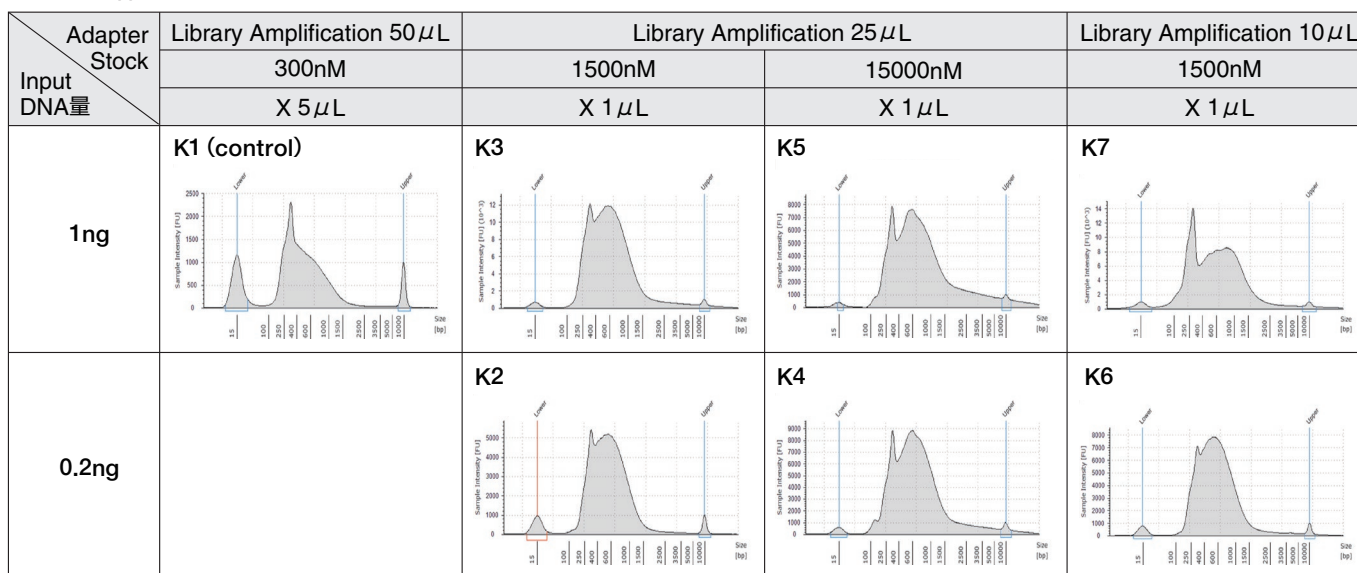
## データベースと解析ツール

項目	バージョン
リファレンスゲノム	Ensembl Human Genome, Release 90
アノテーションファイル	Ensembl Human GTF, Release 90, GTF
QC, フィルタリング	flexbar 2.4, fastq-mcf, FastQC 0.11.2
ゲノムマッピング	HISAT2 2.0.5
遺伝子発現定量	RSEM 1.3.0
マッピング領域同定	bedtools 2.26.0
カバー率計算	RSeQC (bam2wig.py)

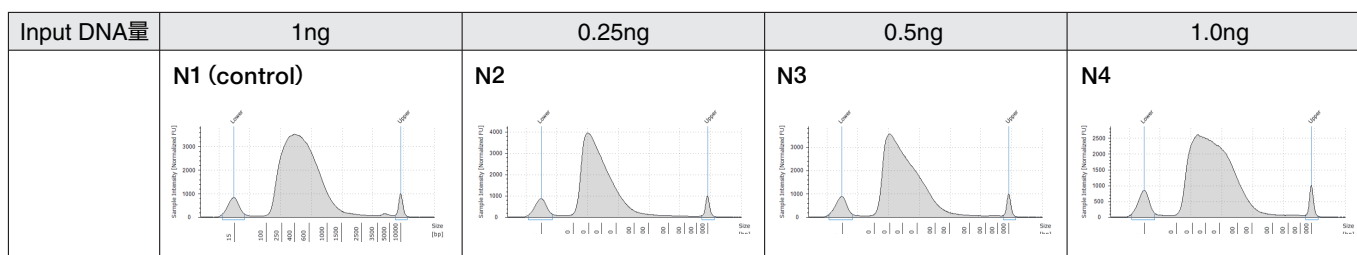
## 結果

## 1. TapeStation によるライブラリーのサイズ確認

## ① KAPA HyperPlus を用いて作製したライブラリー



## ② I社キット N を用いて作製したライブラリー



KAPA HyperPlus で 250bp 付近にピークが見られるが、シーケンスにおいて特に問題とはならなかった。

## 2. シーケンス解析データ

※4 ページ以降の「各解析データ」を参照ください。

## まとめ

項目	KAPA HyperPlus 結果	I社キット N 結果	評価
シーケンス精度	Phred Score 38 にピーク、ただしその割合は I社キット N より少ない	Phred Score 38 にピーク	KAPA ≧ I社キット N
ミスマッチ	約 12 %	約 8 %	KAPA < I社キット N
挿入	約 0.3 %	約 0.3 %	KAPA = I社キット N
欠損	約 0.5 %	約 0.5 %	KAPA = I社キット N
GC 含量	60 % にピーク	50~60% にピーク (コントロールと条件変更サンプルでプロファイルが異なる)	KAPA > I社キット N
シーケンスリード長	cDNA 増幅アダプタ配列を含むためピークが複数*1	cDNA 増幅アダプタがほとんど検出できないためピークは1つ*1	KAPA > I社キット N
ゲノムマップ率	40~60% (マップツールのパラメータで改善可能)	70~80 %	KAPA ≧ I社キット N
インサートサイズ	150~200 bp	50~100 bp	KAPA > I社キット N
転写物カバー率	全体的に一定	3' 側に偏る	KAPA > I社キット N
検出遺伝子数	約 10,000	約 10,000	KAPA = I社キット N
データ再現性	条件によって再現性が低い時がある	条件が同じならば再現性は高い	KAPA < I社キット N
条件変化に対する堅牢性	条件が変化してもあまり変化しない	発現量が高いとばらつく	KAPA > I社キット N
ばらつき	CV 上限 : 0.25 (1000TPM) CV 上限 : 0.5 (100TPM) CV 上限 : 1.0 (10TPM)	CV 上限 : 0.25 (1000TPM) CV 上限 : 0.5 (100TPM) CV 上限 : 1.5 (10TPM)	KAPA = I社キット N (低発現遺伝子以外) KAPA < I社キット N (低発現遺伝子)
試験濃度依存性	濃度を変化させてもほぼコントロールと同等	濃度変化させると、高発現遺伝子の再現性がやや低下 GC 含量によって発現量の変化大	KAPA > I社キット N (再現性) KAPA > I社キット N (GC 含量による発現量の変化)

\*1 (補足)

シーケンスリード長は、SMART-seq2 で使用している cDNA 化および PCR 時のアダプター配列を除去したあとのリード長を解析した。

したがって、特に短いリードは、もともとは PCR 後のアンプリコン末端を含んでいた配列であった。

KAPA HyperPlus はライゲーションベースのため、これらの配列がピークとして出て来ると推察される。

一方、I社キット N は、タグメンテーションベースのため、アンプリコン末端は原理的にリードとしてデータに出て来ないと推察される。

## ■ 総評

特に以下の点が評価され、KAPA HyperPlus のほうが優れていると判断された。

条件として K6 (Ligation1/5 量、Amplification1/5 量、インプット cDNA0.2ng) でも運用可能と判断された。

- GC 含量による偏りが小さい
- インサートサイズが長い。



## お客様のコメント

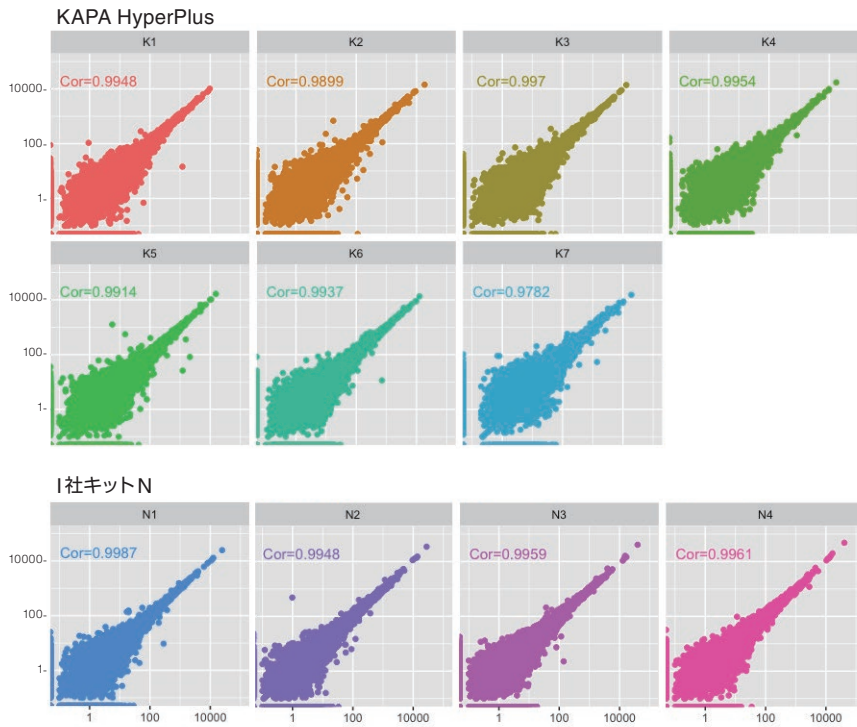
KAPA HyperPlusは酵素処理による断片化をベースとしてシンプルなワークフローで構成されているので、特殊なDNA断片化装置や自動液体分注機や核酸精製機を研究室に導入することなく、簡単に実験に取り入れることができました。本製品は、反応条件をアレンジした際にも安定したデータを産出してくれるので、反応液量を節約することでお財布に(比較的)優しいシーケンスライブラリ調製が可能です。また、ライブラリ作製に慣れない初心者が導入する際にも本製品はオススメできると思います。



## 各解析データ

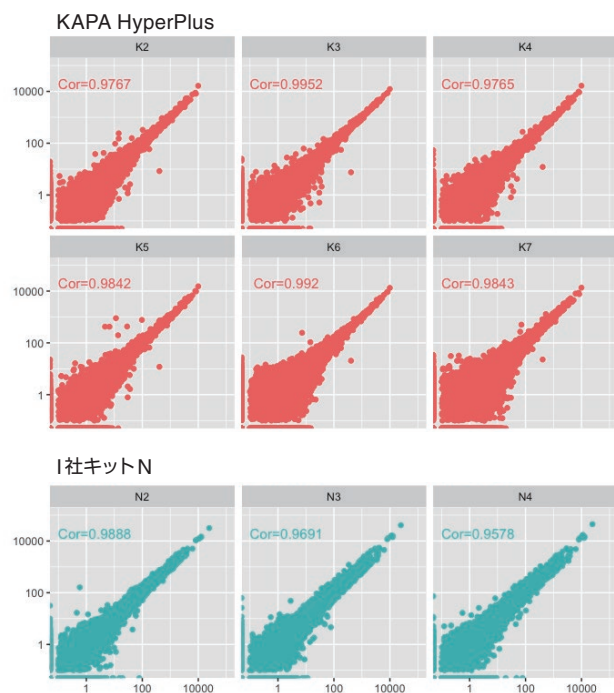
## 1. 遺伝子発現定量の再現性

- 同条件でのサンプル間のばらつきを比較
- K7を除き、いずれの相関係数も0.99以上で、ばらつきはほぼなかった。



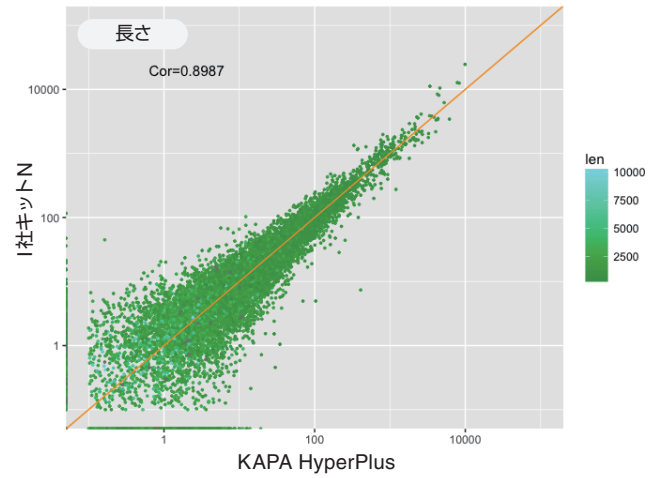
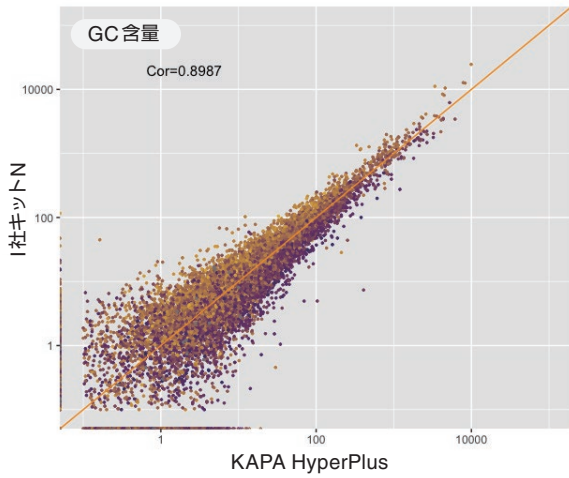
## 2. コントロールとの比較

- K1, N1をコントロールとして、再現性を比較
- KAPA HyperPlusではコントロールとの整合性が高かった。
- I社キットNは、N2を除き、高発現領域の遺伝子の再現性が低かった。



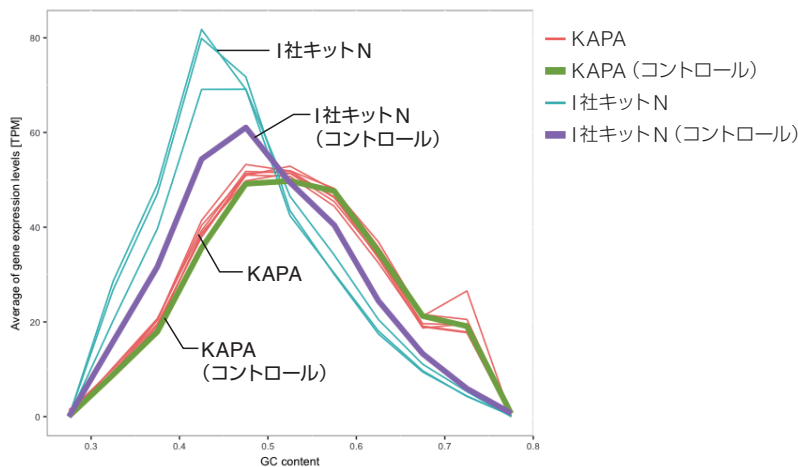
### 3. KAPA HyperPlus と I 社キット N の比較 (GC 含量および長さの影響)

- K1 (KAPA HyperPlus) と N1 (I 社キット N) を比較
- GC 含量によって発現量に偏りの発生が見られた。
- 一方、長さによる影響は見られなかった。



### 4. 各サンプルの GC 含量ごとの平均遺伝子発現量

- I 社キット N は GC 含量が低い遺伝子の方に発現量に偏りが見られた。
- KAPA HyperPlus では、各条件で安定してコントロールと同じ傾向を示した。



### 5. 各サンプルのインサートサイズの分布

- マッピングの結果から、インサートサイズを計算した。
- インサートサイズは KAPA HyperPlus の方が長かった。  
 I 社キット N : インサートサイズ最頻値 100bp 以下  
 KAPA HyperPlus : インサートサイズ最頻値 150 ~ 200bp

