

ブロード研究所でKAPA Library Quantification Kit を採用し、ワークフローの簡素化とクラスター密度の変動性を抑えることに成功

Eric van der Walt¹, Adam Novidi², Gavin J. Rush¹, Michelle W. Nderu¹, John F. Foskett¹, Paul J. McEwan¹, Imane Bourzgui², Maura Costello²,
1 Kapa Biosystems, 600 West Cummings Park, Suite 5350, Woburn, MA, 01801 2 The Broad Institute, 320 Charles St., Cambridge, MA 02141



概要

次世代シーケンス (NGS) のワークフローは、進化し続けている。それは、より高い信頼性、スループット、効率性をユーザーが求めているからである。現在主流となっている3つのプラットフォームの標準プロトコルにおいては、ライブラリーDNA分子を定量化し、シーケンス・テンプレートをクローン増幅する際、手間とコストがかかり信頼性に欠けるといった欠点がある。

純粋にPCR可能なシーケンス・テンプレートを正確に定量化することは、emulsion PCR (emPCR) もしくはbridge PCR (bPCR) によるクローン増幅の信頼性を確保するために必要不可欠である。

過小評価した場合は非クローン性となり、過大評価した場合はクローン増幅したテンプレートの収量不足により非効率となる。原理上、定量PCR (qPCR) は本質的に、NGSライブラリー定量化に適している。^{1,2}

qPCRは、

- 特にPCR可能なDNA分子を定量化する。
- 幅広いダイナミックレンジにおいて正確性がある。
- 自動化リキッドハンドリングに対応可能である。
- 費用対効果が高い。

しかし、NGSライブラリー定量化のための正確で再現性のあるqPCRアッセイには、時間による変動性が最小で、明確に定義されたDNA定量スタンダードが求められる。さらに、今までのqPCR試薬は短い増幅標的に合わせて最適化されていたため、長い標的、不均衡なGC含量、不安定な二次構造では、増幅効率が低くなったり、ライブラリー分子の定量化の信頼性が損なわれる可能性がある。このような条件に対応するため、Kapa Biosystemsは、定義された信頼性のあるDNAスタンダードと最先端のqPCR試薬を含んだ、qPCRベースのNGSライブラリー定量化キットを開発した。この試薬は、*in vitro*での定向進化によりSYBR®ベースのqPCR用に最適化されたDNAポリメラーゼを含んでいる。ここでは、ブロード研究所がKAPA Library Quantification Kitsを導入したことで、Illumina GA IIx でのシーケンスでサンプル前処理のワークフローが改善した事例を紹介いたします。

理論的根拠

標準的な手法でIllumina GA DNAライブラリーを定量化する場合、多くのデメリットがある。一つ目として、全核酸濃度は電気泳動と分光光度測定法によって測定される一方で、最適なクラスター密度は、PCR増幅が可能なDNA分子の濃度の適切さにかかっている。ライブラリー中の増幅可能なDNA分子の比率はサンプルによって異なるので、信頼性のある最適化には、手間とコストのかかるbridge PCR滴定 (タイトレーション) が要求される。二つ目として、これらの手法をとった場合、感度が低く、ナノグラムレベルで貴重なサンプルを消費してしまうか、シーケンスに必要とされる量の約1,000倍以上の分子を消費してしまうことになる。最後に、電気泳動と分光光度測定法では、手間がかかりエラーの起こりやすい手動のリキッドハンドリングが必要のため、ハイスループットのサンプル定量化には適していない。

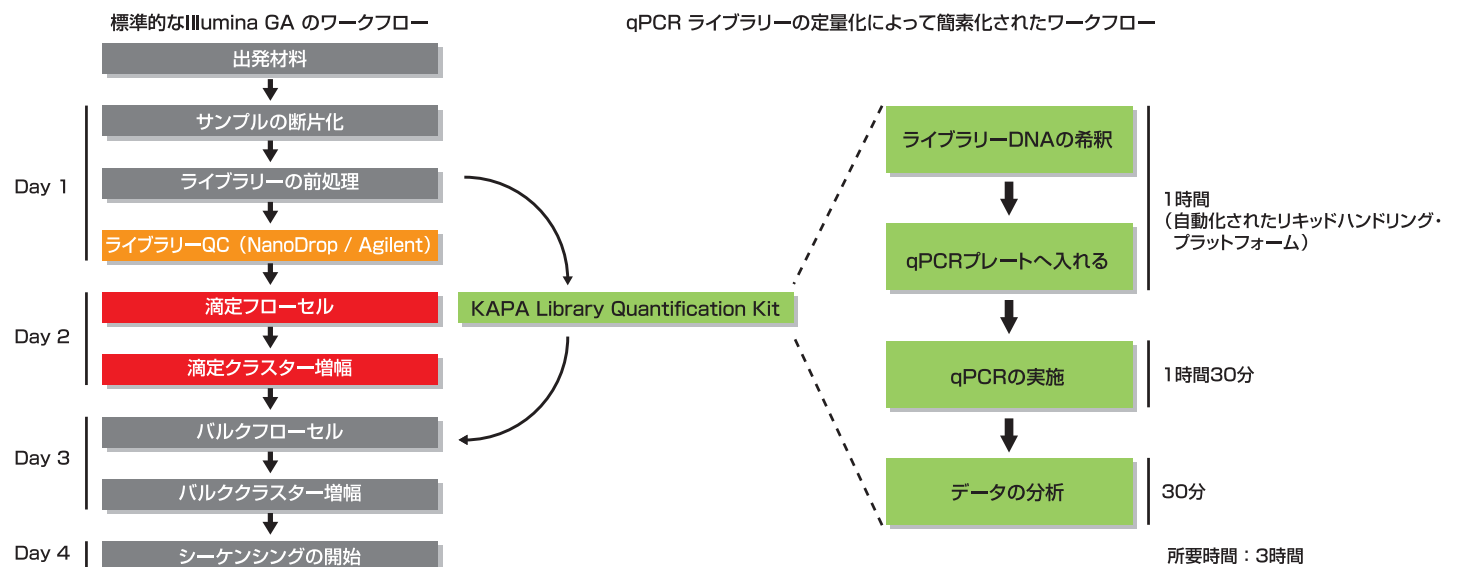
qPCRを用いれば、これらの手法における問題点の多くをクリアできる。qPCRは、純粋で増幅可能なライブラリー分子のみを定量化し、非常に広いダイナミックレンジに渡って正確性があり、ハイスループットのサンプルや自動化リキッドハンドリングに対応できる。さらに、qPCRは非常に感度が高いため、希釈ライブラリーも正確に定量化でき、サンプルの消費も少ない。希釈ライブラリーサンプルから、信頼性のあるクラスター密度を正確に得ることができるため、PCR増幅が少なくて済み、増幅効率の変動性から生じるバイアスを最小限にとどめることが可能である。

ライブラリーDNAの信頼性あるqPCR定量化には、重要な点が2つある。

- 1) qPCR増幅は、フラグメントサイズとGC含量によって異なる幅広いレンジのテンプレートにおいて効率的であるべき。
- 2) 変動性が最小、もしくは別ロットで信頼できるキャリブレーションスタンダードを用いるか、それを長期に渡って使用することが重要。

一つ目の条件をクリアするためKapa Biosystemsは、*in vitro*での定向進化を用いることにより、長くて増幅困難なテンプレートでも増幅できる、強固でSYBR® Green耐性のあるqPCR用DNAポリメラーゼを開発した。二つ目の条件に対しては、再現性が高く厳密に定義された段階希釈DNA定量スタンダードを用いる。これは、品質管理によってロット間の変動が最小限に抑えられている。

qPCRライブラリーの定量化によってワークフローが簡素化され、ハイスループットが可能となった



384ウェル・フォーマットでのアッセイにより、DNA定量スタンダードと共に96サンプルが1回のランで処理できる。Bravo Automated Liquid Handlerを使用したqPCRセットアップの所要時間は約1時間。これに1.5時間のqPCRアッセイを組み合わせることで、1日1人のフルタイム作業員が約500のサンプルを定量化することが可能になる。

方法



図1. ブロード研究所のAgilent Bravo Automated Liquid Handling Platform Illumina GA IIx 装置でのシーケンスの前にqPCRライブラリー定量反応液を前処理するために用いる。

qPCRでIlluminaライブラリーを定量する前に、Quanti-iT™Kit (Invitrogen) を用いてサンプルの大まかな濃度を決定する。qPCRアッセイに過剰量をアプライすることを避けるために、濃度が $>20\text{ng}/\mu\text{L}$ のサンプルを $\sim 15\text{ng}/\mu\text{L}$ に希釈した。Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies) を用い、各ライブラリーサンプルから4段階の倍数希釈 (1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000) を3反復用意し、384アッセイプレートに分注した。自動化リキッドハンドリング・プラットフォームを用い、Illumina GA 用KAPA Library Quantification Kitのテクニカル・データ・シートに従って、 $10\mu\text{L}$ qPCR反応液をアッセイプレートにアッセイした。同様に、KAPA Library Quantification Illumina GA DNA 定量スタンダードを含んだ $10\mu\text{L}$ qPCR反応液を3反復アッセイした。ABI 7900HT Fast Real-Time qPCR装置の推奨プログラムに基づき、384プレートで実施した。

分析と計算は、Illumina GA 用KAPA Library Quantification Kitのテクニカル・データ・シートに従って行った。一時的に、DNA定量スタンダードの濃度 (pM) をqPCR装置の分析ソフトに入力することにより、標準曲線が描かれ、qPCRの効率性が計算できる。その後、このソフトが各ライブラリーサンプル希釈の濃度を算出する。ピペティングエラーなどによる明らかな異常値は除外し、3反復の希釈液から得た残りのデータ点を用い、各ライブラリーサンプルのqPCR効率性を計算した。不正確なピペティングや不完全なqPCR効率の影響を最小限に抑えるため、標準曲線の範囲内に収まっている最も濃度の高いライブラリー希釈を用いて、希釈していないライブラリーサンプルのそれぞれの濃度を計算した。3反復のデータ点は平均化され、最終的な濃度は、ライブラリーフラグメントとDNA定量スタンダード (452bp) のサイズ差異に合わせて調整した。最終的に、調整した濃度を妥当な希釈係数で掛け合わせ、オリジナルのライブラリーサンプルの濃度を算出した。

信頼性の高い定量化による一貫したクラスター密度

ライブラリーDNAの定量化にqPCRを導入する前は、クラスター密度に大きな変動性があった。しかし、KAPA Library Quantification Kitを我々のワークフローに導入したところ、多くのライブラリーで変動性が大きく減少した。

qPCRライブラリーの定量化により、我々のIllumina GAシーケンス・ワークフローではクラスター増幅満定の必要がなくなった。さらに、より高い精度のライブラリー定量により、長期にわたり複数のライブラリーで、より一貫したクラスター密度が実現した。以前は、研究所内で定量スタンダードを調整しようとした場合、新しいスタンダードを導入するたびにクラスター密度に大きなズレが見られた。KAPA Biosystemsによって製造されたDNA定量スタンダードを使えば、この変動性を無くすことができた。

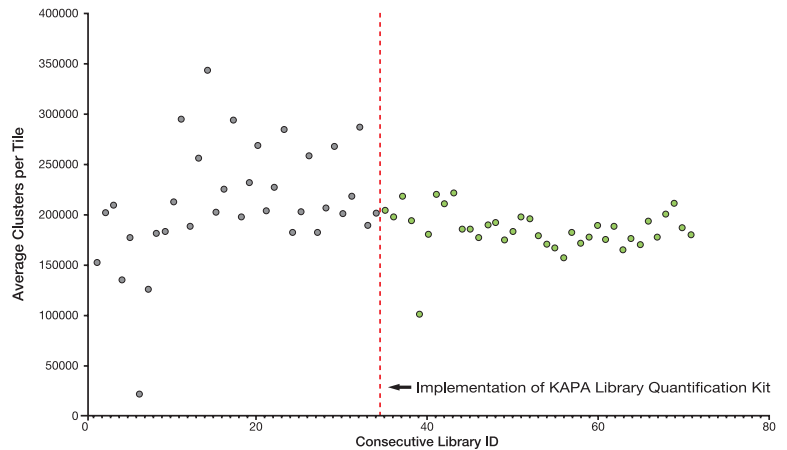


図2. KAPA Library Quantification Kitを導入する前後でのクラスター密度の比較
1タイトルあたりの平均クラスター数がライブラリー毎に示されている。

qPCRライブラリー定量は、低濃度ライブラリーのシーケンスを可能にする



図3. 低濃度ライブラリーのクラスター画像
この 0.3 nM ライブラリーの正確なqPCR定量により、1タイトルあたり $\sim 140,000$ のクラスターと、1レーンあたり $\sim 900\text{ MB}$ を生成することができた。

低濃度のIlluminaライブラリーをシーケンスしなければならない場面は多々ある。多くの場合、研究者は、増幅バイアスを減らす、もしくは避けるために、ライブラリー増幅を最低限に抑えるか完全に無くそうとする。その代わりに、ラボ内でのちょっとしたミスや信頼性の低い試薬は、ライブラリー増幅とゲル抽出の後に予想以上に低い収量をもたらす可能性を秘めている。そのような低濃度のライブラリーサンプルを、分光光度測定法や電気泳動によって正確に定量するのは非常に難しく、効率的なシーケンスのための適切なクラスター密度を得ることは困難である。

ここで示された例では、アダプター連結反応後のサイズ選定のためのゲルローディング中に、多くのサンプルが失われた。それにもかかわらず、ライブラリー構築は通常通り行われた。Quanti-iT™ Kit (Invitrogen) を使用した場合にはサンプル濃度が極端に低いために検知できなかったようなPCR産物でも、我々の標準PCR増幅プロトコルでは得ることができた。増幅バイアスを避けるためにも、シーケンスライブラリーを増幅する際には、我々の標準PCRサイクル数を上回らないようにしている。このライブラリーを再構築する手間とコストを避けるために、qPCRで定量することにした。KAPA Library Quantification Kitを用いて、非希釈ライブラリーの濃度を、アッセイのダイナミックレンジに収まる 0.3 nM にすることに決めた。このライブラリーのクラスター密度は、1タイトルあたりの平均で $140,000$ クラスターだった。そして、1レーンあたり $\sim 900\text{ MB}$ のシーケンスデータを得た。

改良型エンジニアDNAポリメラーゼがqPCRで幅広いテンプレートを効率的に増幅する

正確なqPCRは効率的な増幅に依存しており、SYBR® Greenは野生型Taqポリメラーゼを抑制することで知られている。^{3,4} Kapa Biosystemsは、*in vitro*での定向進化を用いて、SYBR® Greenによる抑制を克服するTaqポリメラーゼを開発した。それにより、野生型酵素にとって課題となっていた標的をqPCRで効率的に増幅することが可能になる。

KAPA SYBR® FAST qPCR試薬は、この改良型エンジニアポリメラーゼをもとに構成されており、KAPA Library Quantification Kitsの付属品である。これにより、幅広いレンジのGC含量や、より長いフラグメントを強固に定量することができる。

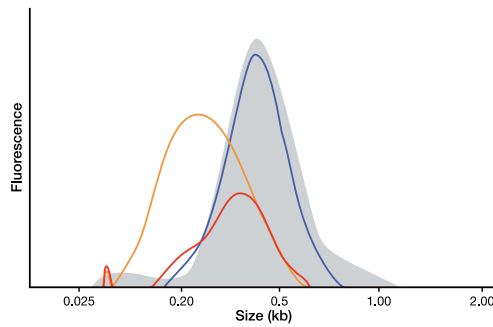


図4. qPCR前後のフラグメントサイズの分布
市販の3種類のqPCRマスターミックスを使用し、qPCR増幅の前後によるフラグメントサイズの分布を比較した (KAPA SYBR® FAST (ブルー) / Stratagene Brilliant SYBR II (レッド) / Finnzymes DyNAmo (オレンジ))。グレー部分がqPCR前を示す。
Stratagene MX4000 qPCR装置を用い、以下のサイクルプロトコルに従って反応を行った。
95°C/10分間、95°C/10秒と60°C/45秒を40サイクル

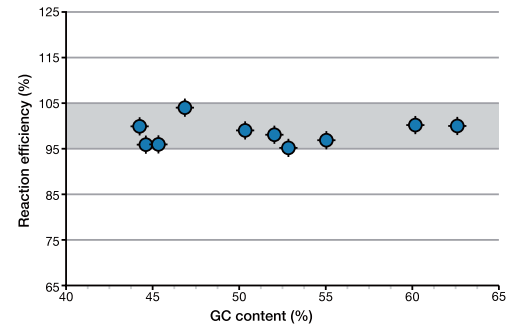


図5. KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kitを使用し、様々なGC含量の10種類のハウスキーピング遺伝子で増幅効率を測定した。GC含量やアンプリコンの長さに関係なく、10種類の遺伝子における反応効率が適性レンジである95–105%に収まった。

強固な増幅が、多様なライブラリーの正確なqPCR定量をもたらす

多様なライブラリーのqPCR定量の信頼性をテストするため、KAPA Library Quantification Kitを用いて、特異にGC含量が高い/低い2種類のIllumina GAライブラリーの濃度を決定した (*Rhodococcus sp.* ~70% GCと *Staphylococcus sp.* ~35%)。両方のライブラリーとも≥95%の効率で増幅した。

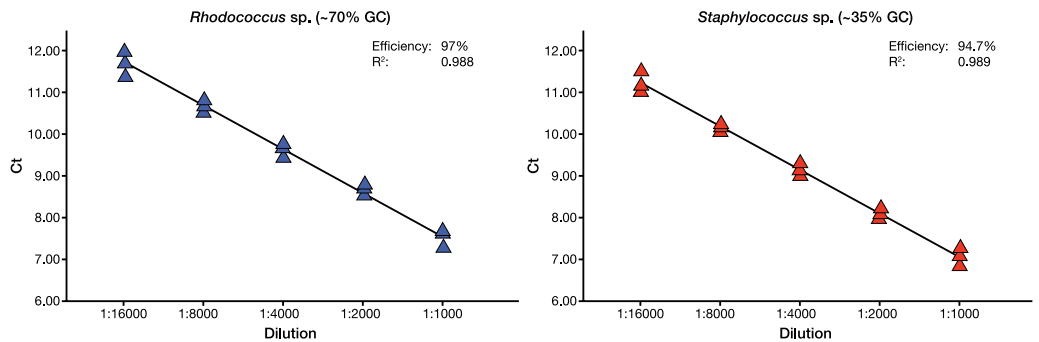


図6. 高GC含量と低GC含量ライブラリーの増幅効率
倍数希釈 (1:1000から1:16000) をそれぞれ3反復用意し、製品のテクニカル・データ・シートに従ってqPCRを行った。

ロット間・キット間の一貫性は、クラスター密度の変動を抑えるために必要不可欠

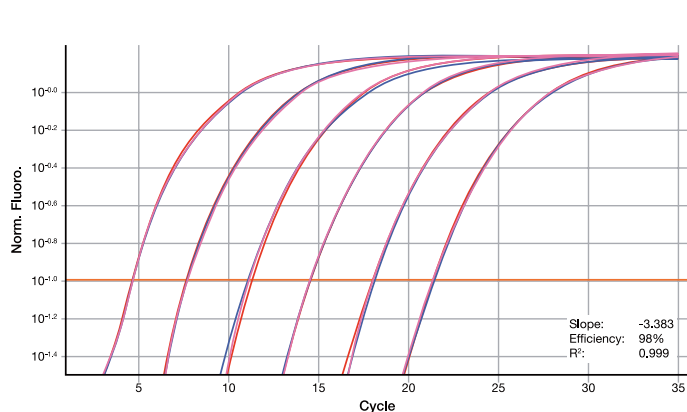


図7. KAPA Illumina Library Quantification Kitのロット間差
それぞれの定量スタンダードの増幅プロットを分析することにより、3つの異なるロット (レッド、ピンク、ブルー) を比較した。各データポイントの3反復を平均化した。

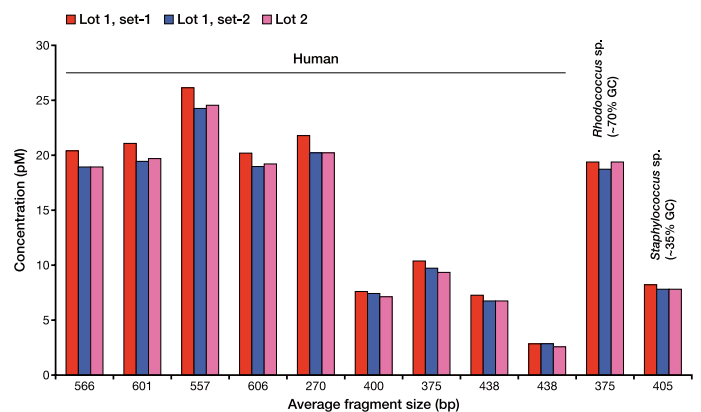


図8. ロット間・キット間の変動性が最小
9種類のヒトDNAライブラリーと2種類の微生物DNAライブラリーで、定量結果の比較をした。異なるロット (Lot 1とLot 2) と、Illumina GA Library用KAPA Library Quantification Kitsの同一ロットから得た異なる試薬のセット (set 1とset 2) を用いた。

References

- Meyer, M., Briggs, A.W., Maricic, T., & Ho, B. (2007). From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36 (1):e5.
 - Quail, M. A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P. J., Durbin, R., et al. (2008). A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods*, 5 (12), 1005-1010.
 - Arezi, B., Xing, W., Sorge, J.A., & Hogrefe, H.H. (2003). Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal. Biochem.* 321 (2):226-35.
 - Kermekchiev, M.B., Kirilova, L.I., Vail, E.E., & Barnes, W.M. (2009). Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude samples. *Nucleic Acids Research*, 37 (5):e40.
- For correspondence: Dr. Eric van der Walt (eric.vanderwalt@kapabiosystems.com) and Adam Navidi (anavidi@broadinstitute.org)