

KAPAエンジニア酵素を利用した微量サンプルからのマルチプレックスNGSライブラリー調製の成功事例

○角川 弘晃¹、江畑 明彦¹、鈴木 智¹、笹川 洋平²

¹日本ジェネティクス株式会社 ²理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニット

次世代シーケンスにおいては、シーケンサーの性能を引き出し、高品質なデータが得られるようなライブラリー調製方法およびその品質管理方法を確立することが非常に重要となる。ここでは、illumina社次世代シーケンサー用マルチプレックスライブラリー調製において、KAPABiosystems社のエンジニア酵素を用いることで、0.1-10ngという微量なサンプルから、非常にロバストなライブラリー調製に成功された事例を紹介する。

参考文献

Genome Biology 2013, 14:R31
 Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity, Yohei Sasagawa and Itoshi Nikaido, *et al.*

■日程: 9月4日(1日目)/スポンサーセッション①(14:50~15:35)
 ■会場: C会場
 ■「1細胞Quartz-Seq法誕生までの開発の道のりと今後の展開」
 講演者: 笹川洋平
 (理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニット)

LIMprep : Ligation based illumina Multiplex library PREparation method

今回開発されたLIMprep法のプロトコルどおり、断片化した10ngのマウスゲノムDNAを用い、以下のキットによりライブラリー(n=9)を調製し、illumina社MiSeqにて評価した。

- 次世代シーケンサー : illumina社MiSeq
- 初発サンプル : 断片化したマウスゲノムDNA 10ng
- ゲノムDNA断片化方法 : Covaris S220(エムエス機器社)を100bp断片化の標準設定どおり使用

- ライブラリー調製キット : KAPA Library Preparation kit (KAPA Library Amplification kitを含む)
- ライブラリー増幅のサイクル確認 : KAPA Real-Time Library Amplification kit
- ライブラリー増幅用試薬 : KAPA Library Amplification kit (KAPA HiFi HotStart enzyme)
- ライブラリー定量キット : KAPA Library Quantification kit



[LIMprep Workflow]

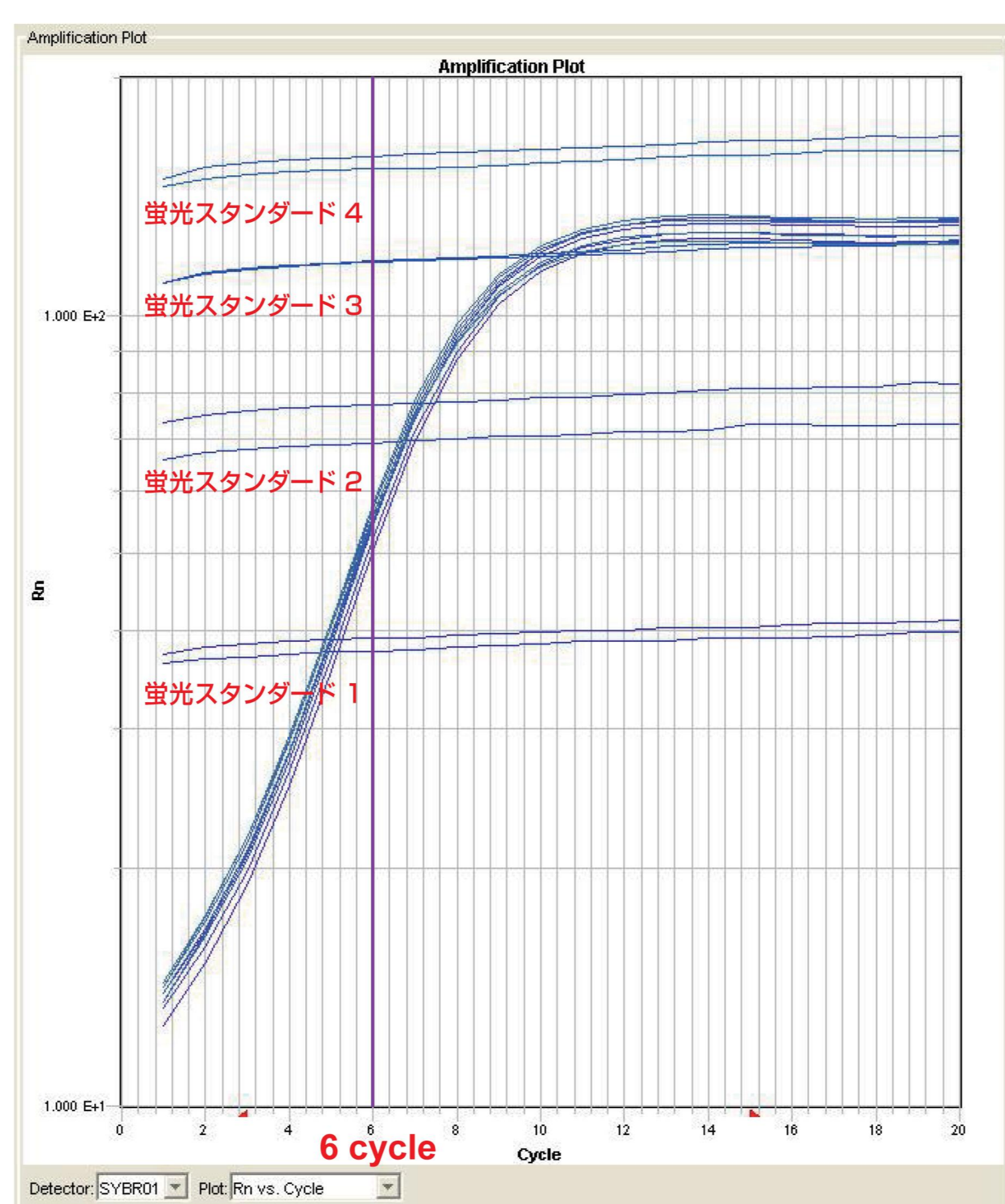
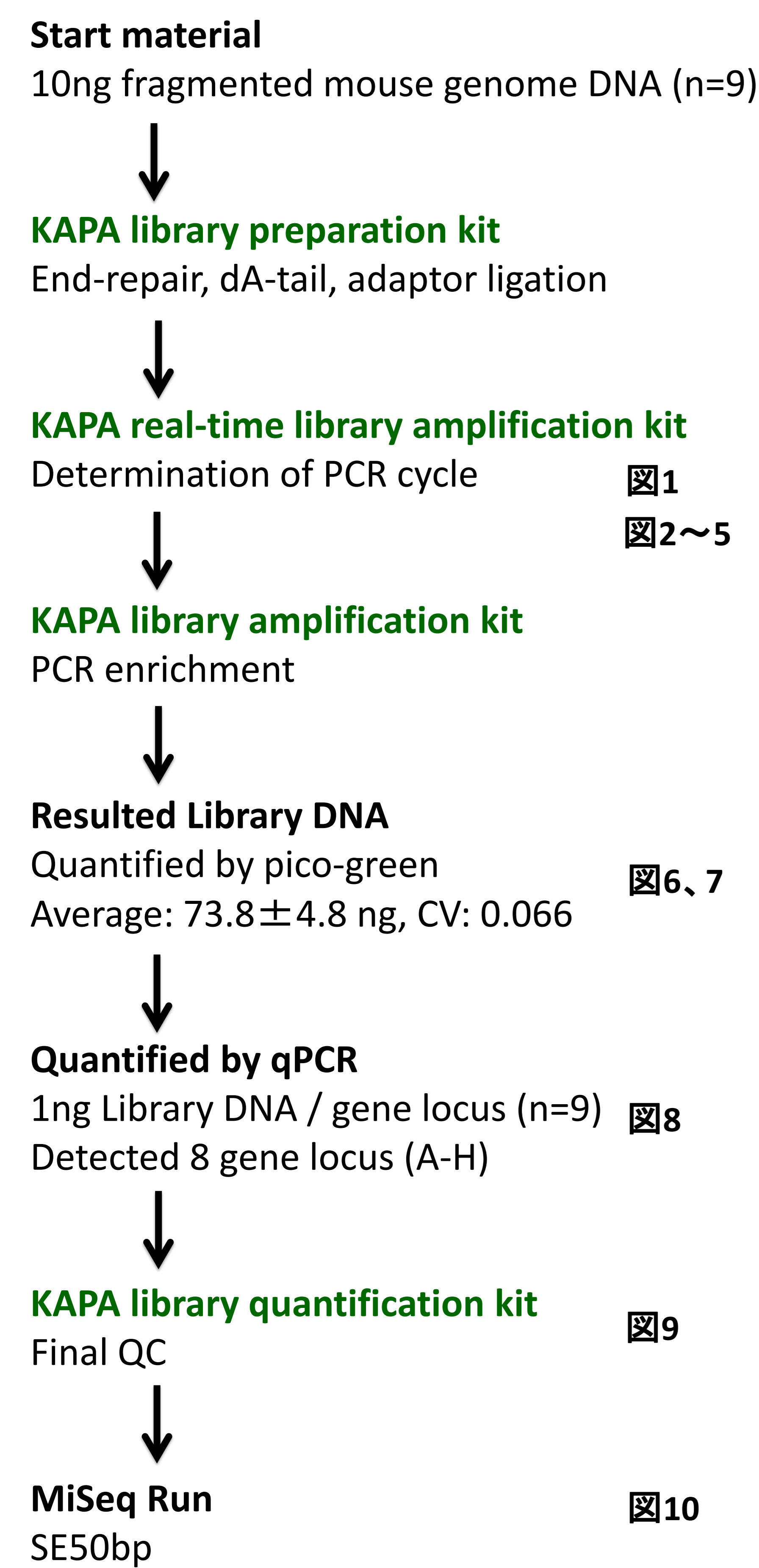


図1 KAPA real-time library amplification kitを用いることで、リアルタイムPCR装置で最適な増幅サイクル数が決定できる。今回は6サイクルであった。

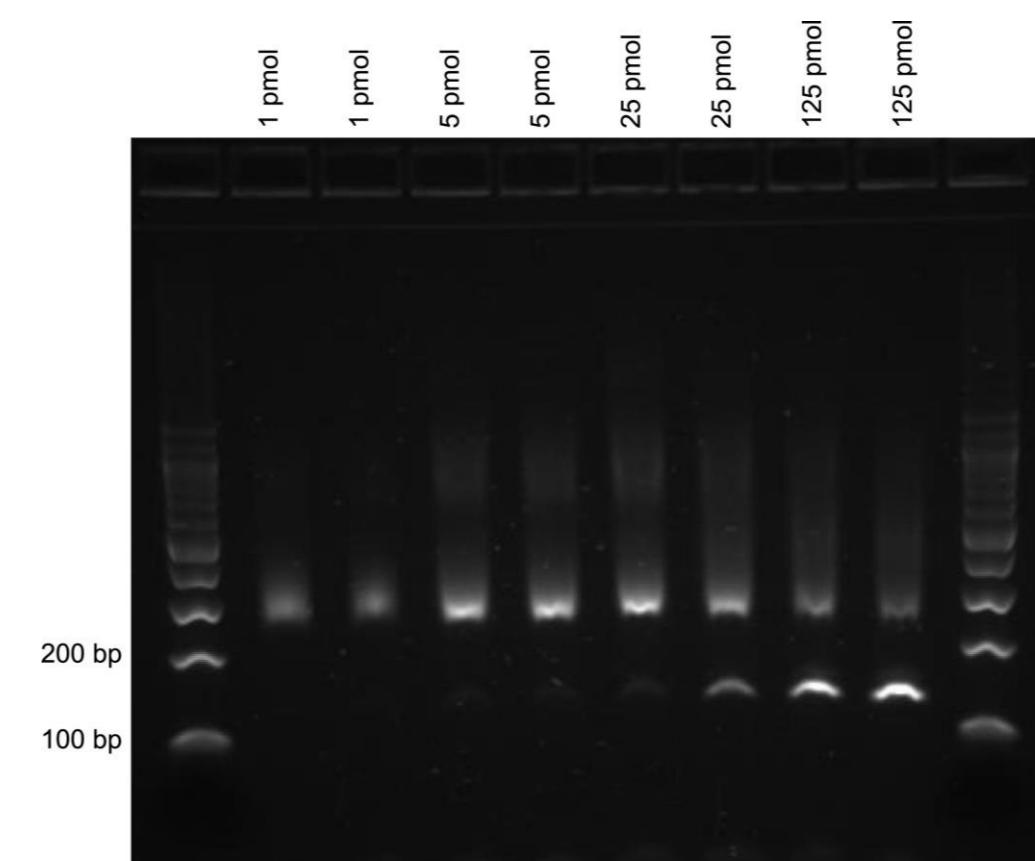


図2 KAPA real-time library amplification kitで増幅したサンプルを品質確認に応用することが可能である。増幅後のサンプルを電気泳動し、アダプターダイマーが見られるような場合(矢印)、元のサンプルを再精製することで、アダプターダイマーの発生を未然に防止することができる。

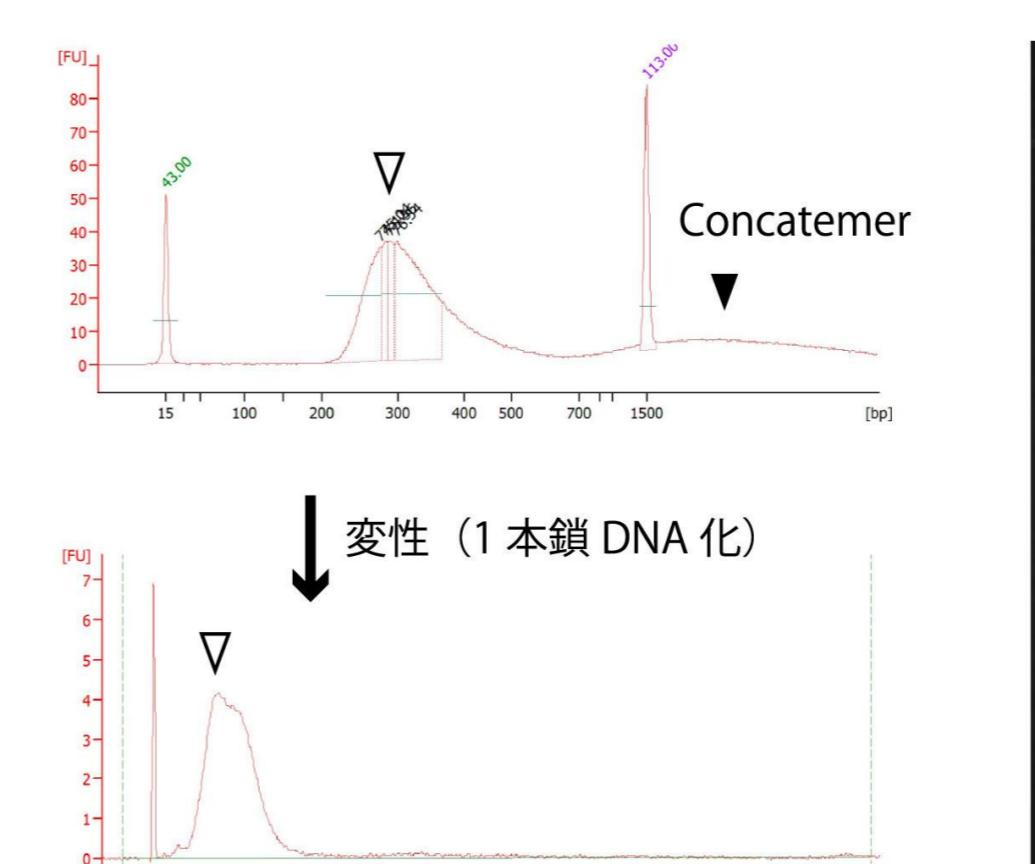


図3

KAPA real-time library amplification kitでライブラリー増幅の最適サイクルを決定することは非常に重要なポイントのひとつとなる。過剰増幅すると、コンカテマーが発生し、正確なサイズ情報が得られなくなる(図3、4)。また、高濃度ライブラリーは、濃度の測定にも問題が生じる可能性がある(図5)。

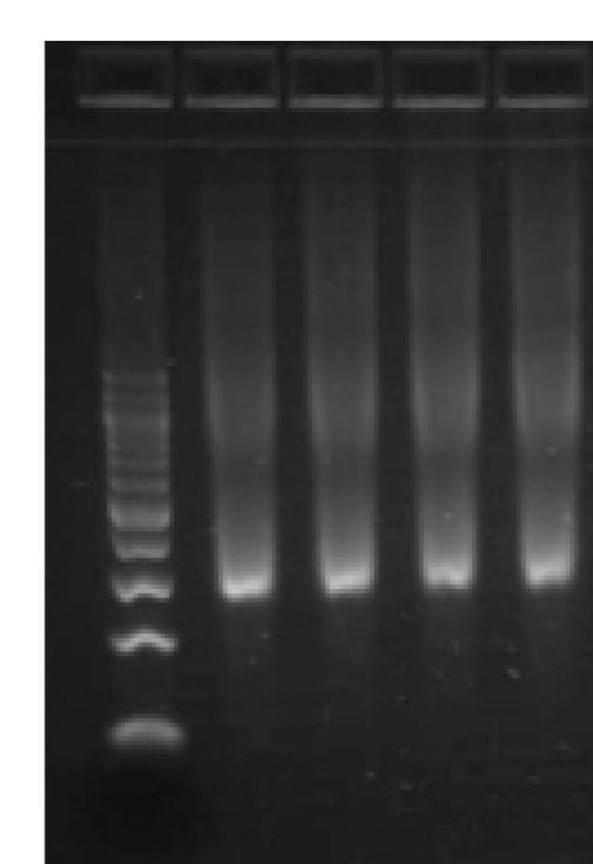


図4

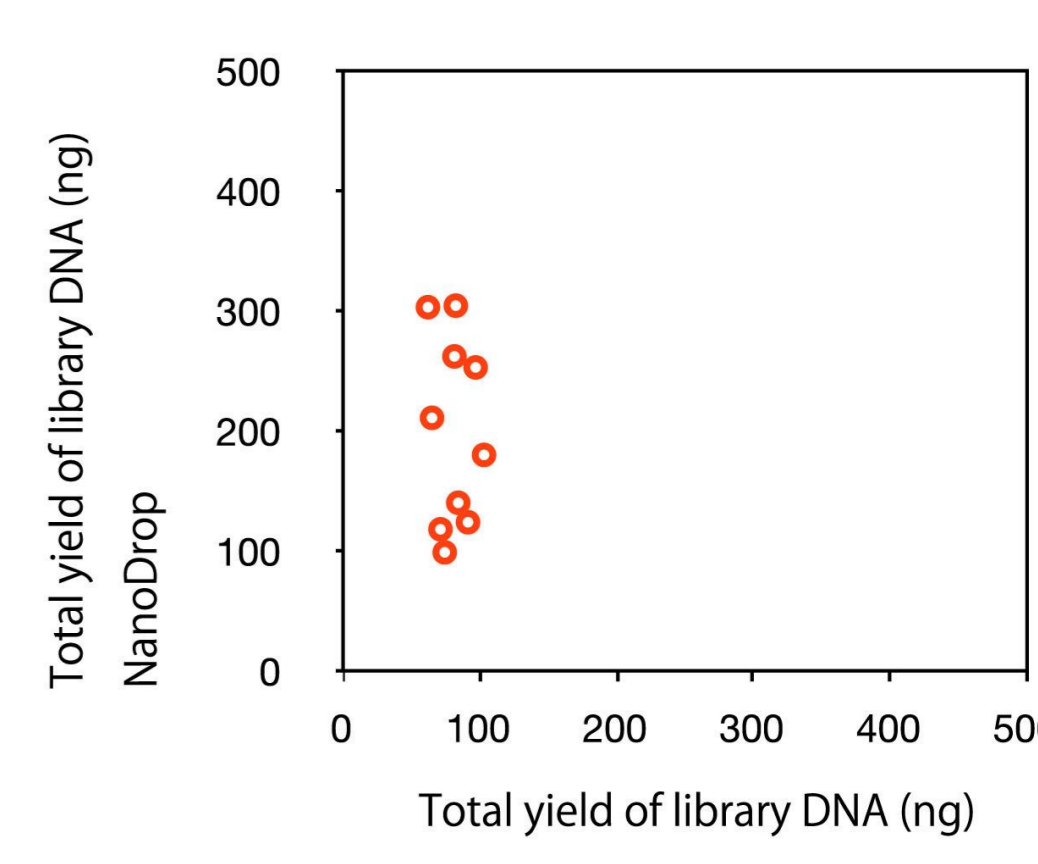


図5

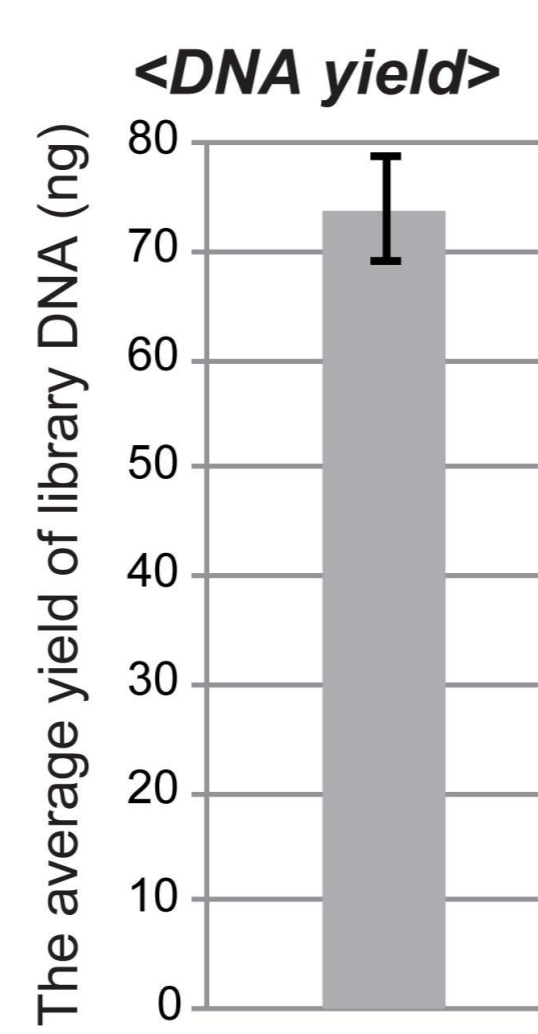


図6

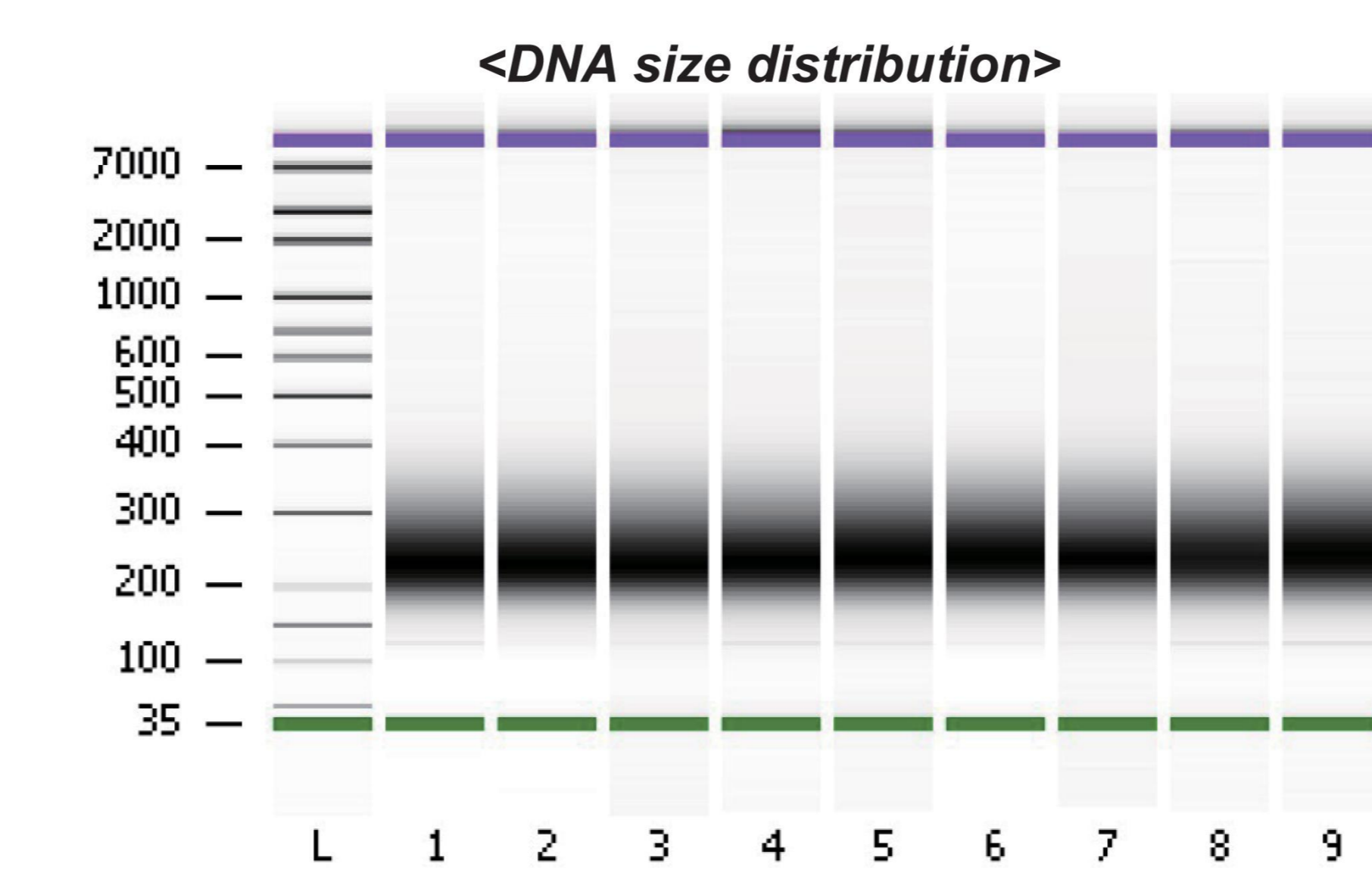


図7

KAPA library amplification kitには、GC/ATリッチな領域でも増幅バイアスを最小限に抑制できるエンジニア酵素 (KAPA HiFi HotStart 酵素)が採用されている。本酵素を用い、ライブラリーを6サイクルで増幅した結果、安定したサイズ分布で一貫したライブラリー増幅結果が得られた(図6、図7)。また、8種類のlocusをqPCR定量で確認したところ、いずれのlocusも偏りなく増幅されていることが確認された(図8)。

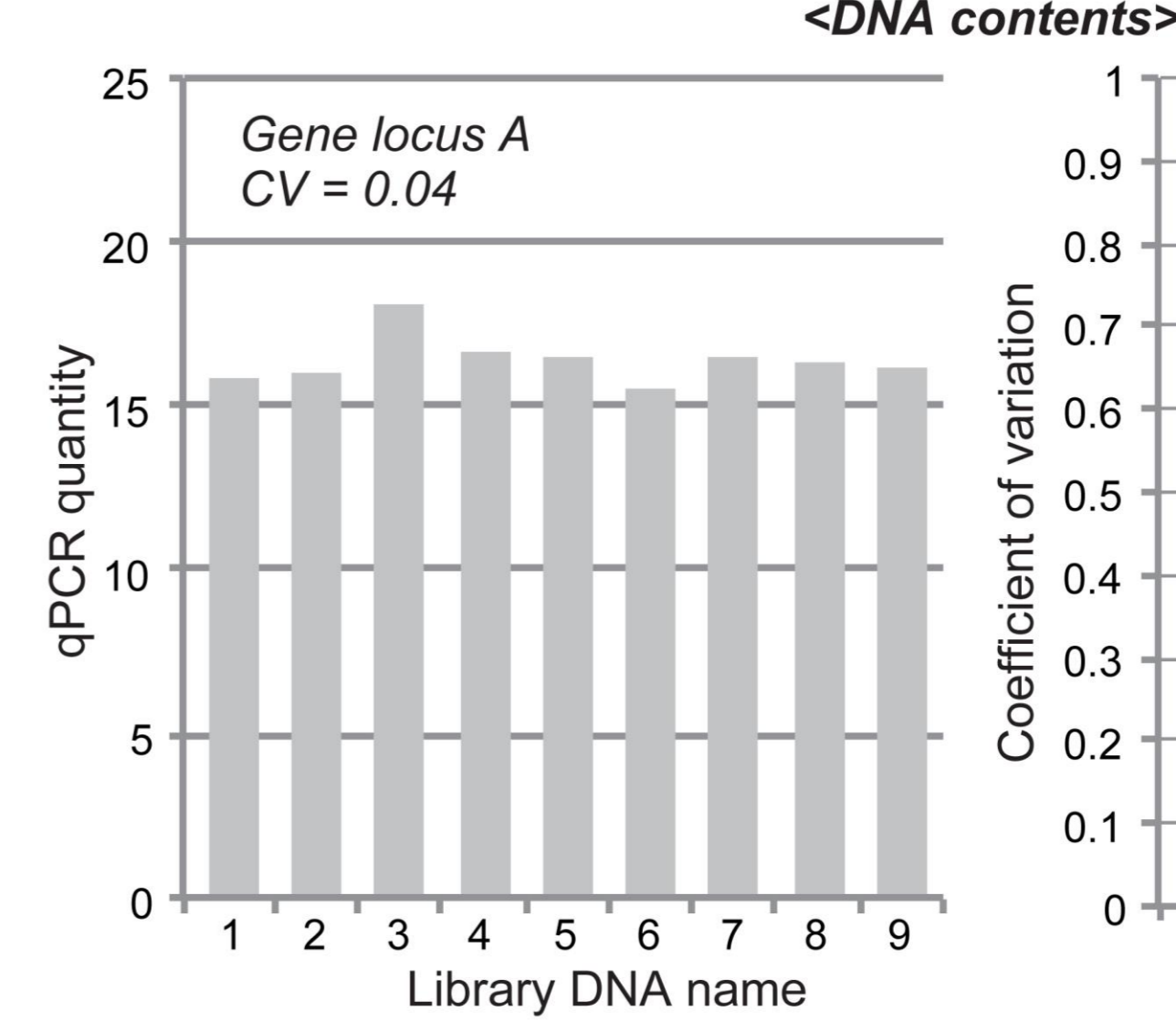


図8



図9 KAPA library quantification kitは、qPCRによる定量をベースとしたシステムである。BridgePCRで増幅される“有効なライブラリー”のみを定量することができるため、クラスター形成に最適なライブラリー濃度情報を得ることが可能となる。

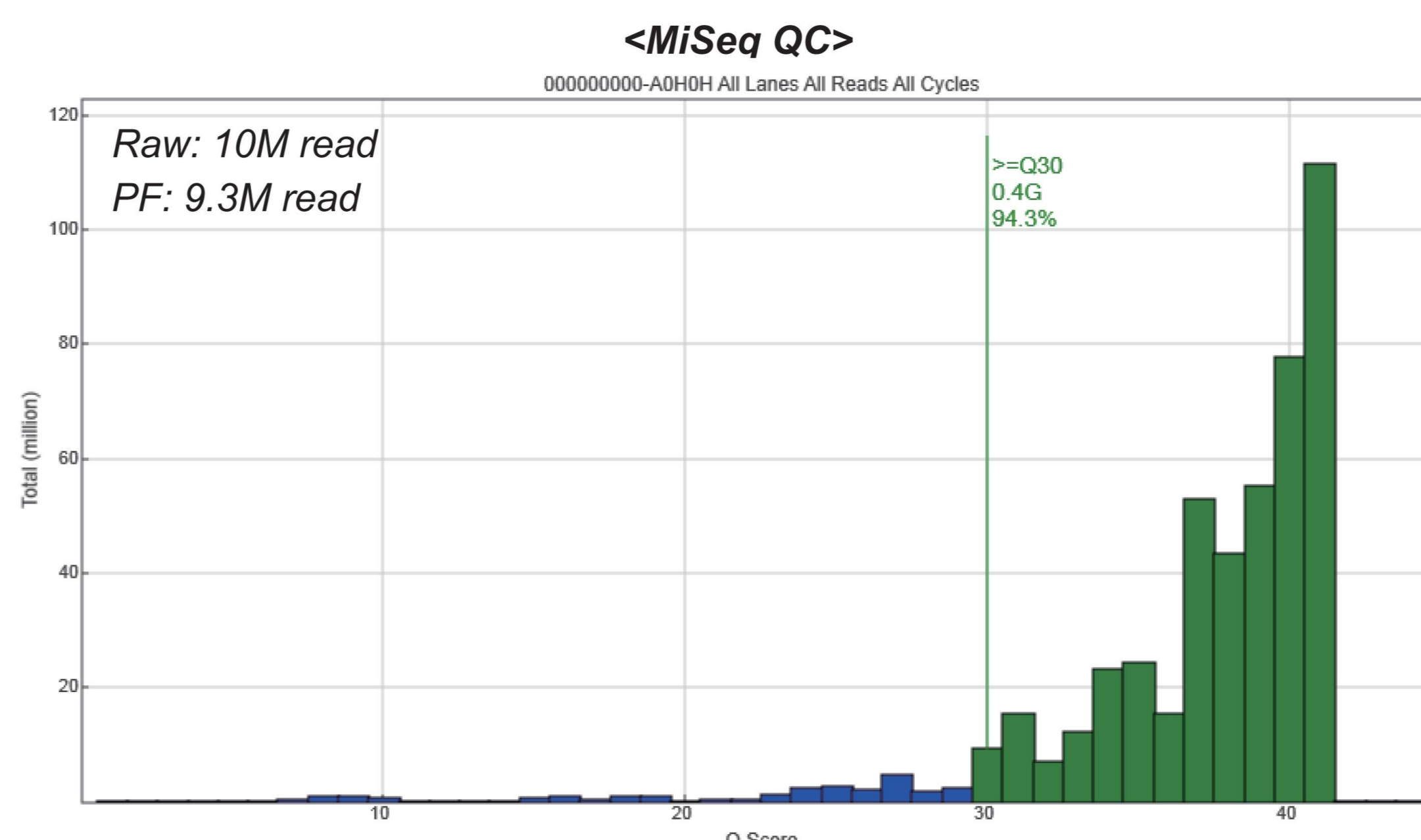


図10

KAPA library quantification kitでライブラリー濃度を決定し、MiSeqのシングルエンドリード(50bp)でシーケンスを実施した。その結果、RAWリード10M read(パスフィルターリード9.3M read)、Q30以上が0.4G base (94.3%)という高い品質のシーケンスデータが得られた。

良いシーケンス結果を得るためには、良いライブラリーを調製し、きちんと品質管理することが非常に重要となる。

まとめ

ライブラリー調製およびその品質チェックにKAPA Biosystems社のエンジニア酵素を用いることで、0.1-10ngという微量なサンプルでも、MiSeqシングルエンドリード(50bp)のシーケンスにおいて、RAWリード10M read(パスフィルターリード9.3M read)、Q30以上が0.4G base (94.3%)という高い品質のシーケンスデータが得られた。