

KAPA エンジンア酵素を利用した ヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) タイピング法の開発事例

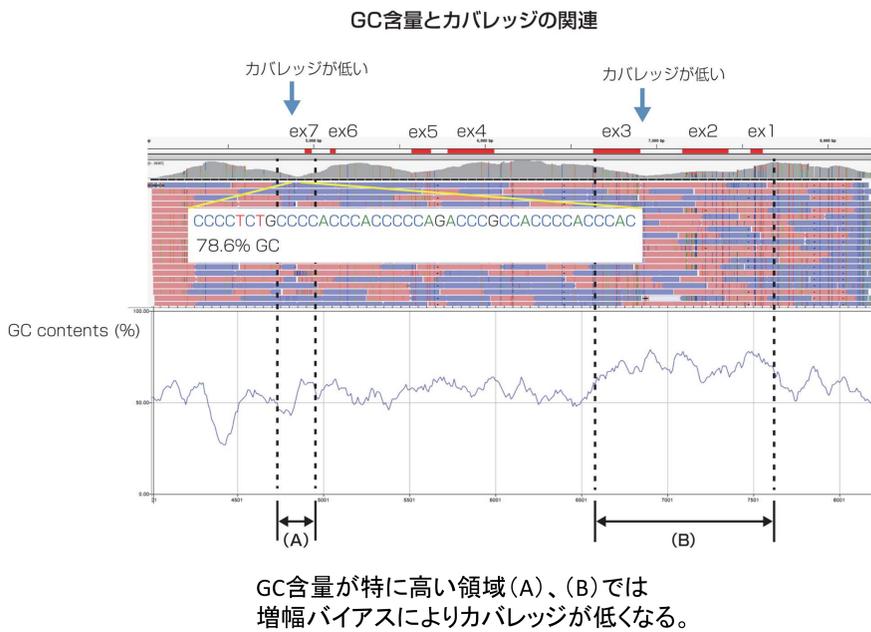
○江畑 明彦¹、鈴木 智¹、尾畑 浩司¹、細道 一善²

¹日本ジェネティクス株式会社 ²国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門

ライブラリー増幅時の「GC/ATリッチな領域の増幅バイアス」が、データ解析において「カバレッジの低下」として大きな問題となる場合がある。ヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) タイピング法の開発におけるライブラリー増幅時のGCバイアスの問題に対し、KAPABiosystems社のエンジニア酵素であるKAPA Library Amplification kit (KAPA HiFi DNA polymerase)を使用することで劇的に改善された事例を紹介する。

■日程:9月5日(2日目)/スポンサーセッション③(9:00~9:45)
 ■会場:C会場
 ■「次世代シーケンサーを用いた、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体(HLA)タイピング法の開発」
 講演者:細道一善(国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門)

問題点



検証方法



KAPABIOSYSTEMS



ライブラリーの増幅ステップで KAPA Library Amplification Kit を用いた。

反応組成	
2×Kapa HiFi HS RM	25uL
50×Nextera Primer Cocktail	5uL
Index×1 primer	5uL
Index×2 primer	5uL
Tagmented Library	10uL
	50uL RXN

PCR サイクル	
Initial Extension	72°C 3min
Denaturation	98°C 30sec
Denaturation	98°C 10sec
Annealing	63°C 30sec
Extension	72°C 3min
Hold	10°C
	7cycles

KAPA Library Amplification kit (KAPA LA 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 HotSart 酵素) が採用されている。

結果

解析結果の可視化
Integrative Genomics Viewer (IGV)



KAPA LA kitでライブラリー増幅を実施したところ、カバレッジが低かった(A)、(B)の領域で劇的な改善が見られた。

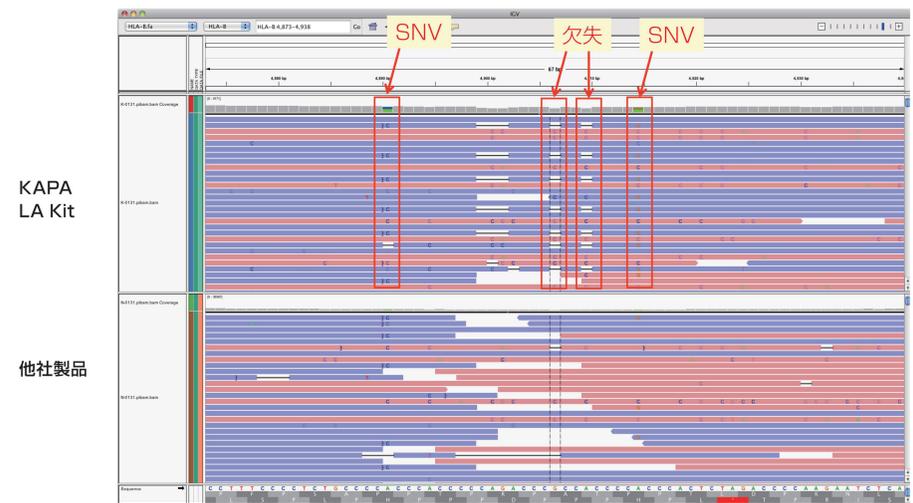
HLAタイピング結果の比較 (HLA-B, cDNA database)

Sample name	PCR-SSO法 (従来法)		KAPA LA Kit		他社製品		Depth	
	allele 1	allele 2	allele 1	allele 2	allele 1	allele 2	KAPA LA	他社製品
サンプル1	B*54:01:01	B*57:01:01	B*54:01:01	B*57:01:01	No call	No call	5140.46	5329.84
サンプル2	B*38:01:01	B*58:01:01	B*38:01:01	B*58:01:01	No call	B*58:01:01	4852.13	5612.92
サンプル3	B*15:02:01	B*51:01:01	B*15:02:01	B*51:01:01	No call	No call	5692.53	5903.77
サンプル4	B*48:01:01	B*58:01:01	B*48:01:01	B*58:01:01	B*48:01:01	B*58:01:01	5948.66	5443.36
サンプル5	B*40:49	B*58:01:01	B*40:49	B*58:01:01	B*40:49	B*58:01:01	5878.22	3029.58

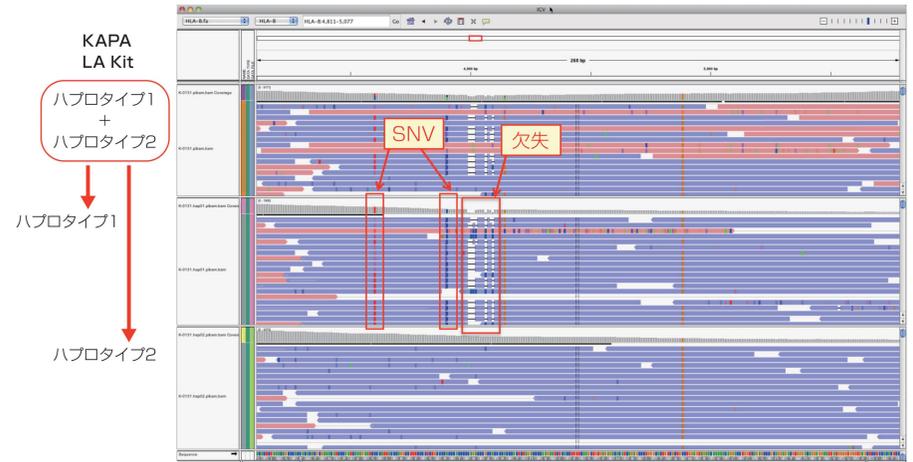
No call: カバレッジの低い部分のハプロタイプを完全に分けることができず、完全長のHLA遺伝子のシーケンスが得られなかった。

このようにヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) タイピング法*の開発において、KAPA LA Kitを使用することで、効果的な結果が得られることが示唆されました。
 * 本法のより詳しい内容は、上記スポンサーセッションにてお聞きいただけます。

欠失およびSNVの検出と比較



欠失およびSNVのハプロタイプの決定



KAPA LA kitによるライブラリー増幅でカバレッジが改善したことにより、SNVや欠失の検出感度が向上した。さらに、これら変異のハプロタイプを分けることも可能であった。

まとめ

Nextera DNA Sample Prep Kit は短時間で簡単にライブラリー調整可能な優れた製品であるが、プロトコールの一部であるPCR増幅にKAPA Library Amplification Kitを用いたところ、GC含量の高い領域でも十分なシーケンスリードが得られ、問題になっていたGCバイアスが劇的に改善された。また、カバレッジのバイアス軽減はより少ないシーケンスリード数でも信頼性の高い解析を可能とするため、より多くのサンプルを一度にシーケンスすることが可能となった。