

次世代シーケンスを失敗しないための最新ライブラリー調製法

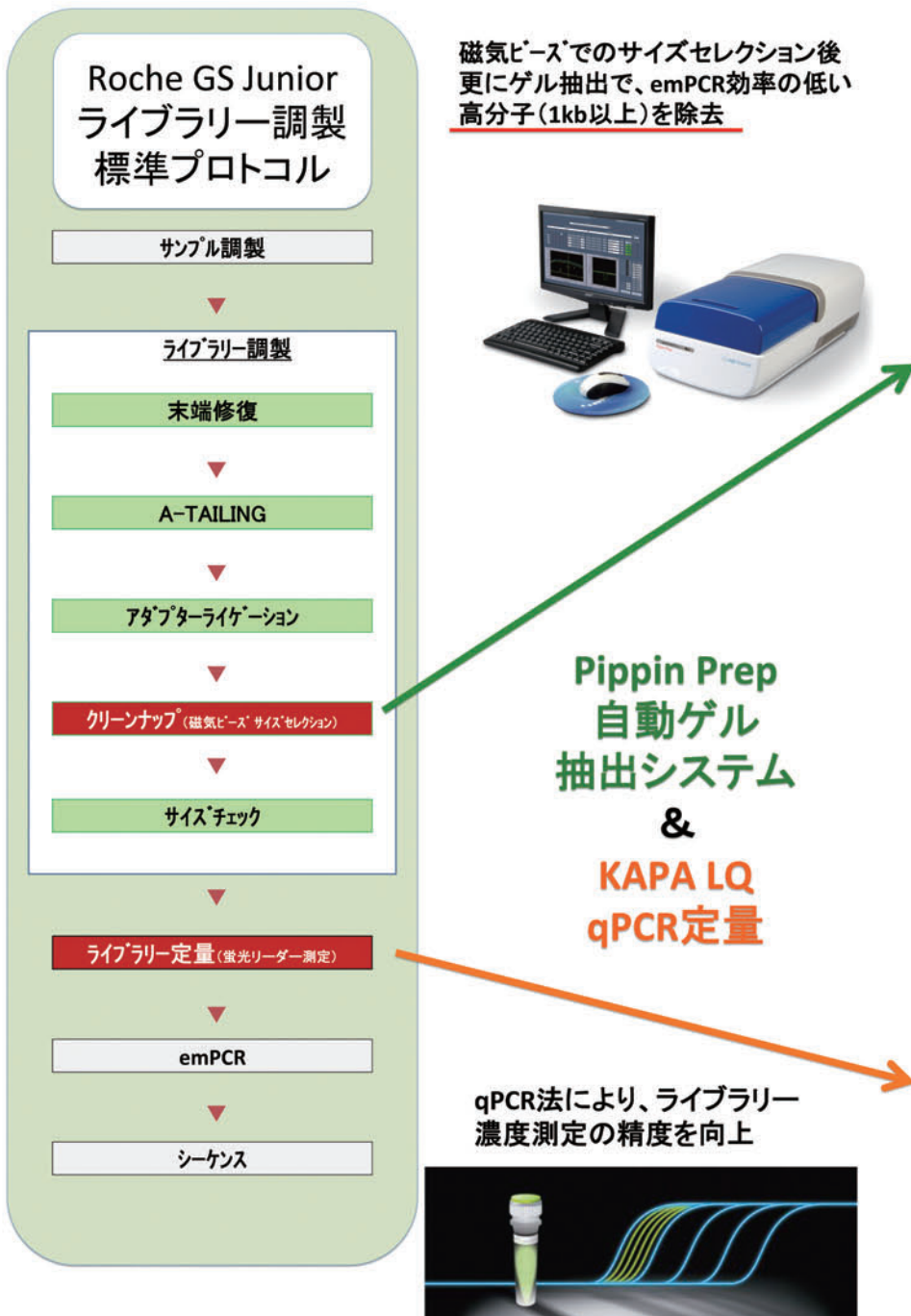
～Roche GS Junior 標準ライブラリー調製プロトコルの改良例～

○鈴木 智、笹森 史郎、江畑 明彦、馬場 憲三、角川 弘晃、佐藤 一則
日本ジェネティクス株式会社

＜プロトコル改良方法＞

1) Sage Science 自動ゲル抽出システム Pippin Prep を用いて、PCR効率が低いと予想される高分子のライブラリー除去
→ emPCR効率を向上させ、リード数およびリード長の向上を目指す

2) KAPA Library Quantification (LQ) kit を用いた qPCR法によるライブラリーの定量
→ PCR可能な分子のみを定量することで、emPCRの再現性向上を目指す



アプリケーションノート SS2011DEC005

製品名 : 自動DNA断片ゲル抽出システム Pippin Prep (PIP001)
メーカー名 : Sage Science社
アプリケーション: ゲル抽出による高分子DNAを除去したライブラリー作成でのリード数の向上

このアプリケーションノートは、独立行政法人 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 杉山真也様のご厚意により掲載させていただきます。

実験条件

- 比較検証方法: 同一のサンプルを、①AMPureXPで精製、②AMPureXP+PippinPrepでそれぞれサイズ分画し、ライブラリー調製しました。その後、Agilent社BioAnalyzer DNA High Sensitivity DNA Assayチップを用いて、分画サイズを確認しました。さらに①、②それぞれのライブラリーをシーケンスし、結果を比較しました。
- サンプル情報: サンプル: シーケンス用ライブラリーサンプル
- ライブラリーキット: GS FLX Titanium Rapid Library Kit
- 泳動条件: ゲルカセット: 1.5%ゲルカセット
抽出条件: レンジモードで500~900bpを抽出
- シーケンサー: Roche GS Junior
- ライブラリー定量: Kapa Library Quantification Kit を用いたqPCRで測定

実験結果

●分画したDNAの解析結果 (Agilent社BioAnalyzer DNA High Sensitivity DNA Assayチップ)

①AMPureXPのみで精製

②AMPureXP+PippinPrepで精製 (約1kb以上の高分子を除去)

●シーケンス結果

	AMPure [®] XPでの精製のみ	AMPure [®] XP+PippinPrepで精製
raw wells	235,956	215,592
Key pass wells	229,899	210,863
Passed filter wells	131,841	144,418
Passed filter	57.35	68.49
Ave Read Length (bp)	373.40	454.42
Total bases (bp)	49,229,958	65,625,734
読み取り率	100%	89.97%
エラー率	≥98%	85.63%
再現性	≥93%	90.41%

＜お客様コメント＞
PippinPrepで高分子DNAを除去する事により、リード数 (passed filter wells)と平均リード長が向上しました。コントロールビーズのシーケンス結果を考慮しても、PippinPrepでの高分子除去は、総解読量 (total bases) の向上に効果的と考えられます。

お客様からの製品フィードバック KP2011DEC4851

製品名 : KAPA Library Quantification kits (KK4851)
メーカー名 : KAPA BIOSYSTEMS 社
アプリケーション: qPCR法を用いたライブラリー定量による、次世代シーケンス・リード数の安定化 (Roche社 GS Junior)

このアプリケーションノートは、独立行政法人 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 杉山真也様のご厚意により掲載させていただきます。

比較検討方法

qPCR定量法の導入前後で、次世代シーケンスのリード数のバラツキの違いを散布図にして比較しました。
・導入前のライブラリー定量法: 蛍光測定 (Roche社 標準プロトコル)
・導入後のライブラリー定量法: qPCR法 (KAPA Library Quantification kit, 型番KK4851)

qPCR装置 : Roche LightCycler[®] 480
ライブラリーDNA : HBVウィルスゲノム
ライブラリー作成キット : Roche社 GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit
次世代シーケンサー : Roche GS Junior

結果

KAPA導入前		KAPA導入後	
ラン数 (回)	リード数	ラン数 (回)	リード数
1	79434	11	119163
2	106940	12	143241
3	49626	13	98083
4	80876	14	144418
5	132398	15	115448
6	68451	16	120959
7	78724	17	131841
8	84392	18	107660
9	64651		
10	75632		

ライブラリーの定量化にqPCRを導入する前は、リード数が約65,000 ~ 132,000と全く安定しなかった。しかし、KAPA Library Quantification kits を導入したところリード数は約100,000 ~ 140,000と非常に安定し、その後のシーケンシングの効率が非常に良くなりました。

まとめ
Pippin Prep およびKAPA LQ kit を用いて Roche 社 GS Junior の標準プロトコルを改良しました。
その結果、リード数の安定化と総解析塩基数の向上が得られました。

＜お客様のコメント＞
KAPA Library Quantification kitsはメーカーの濃度調製済標準溶液がついているため、簡便で再現性の高い測定が可能です。それにより期待したリード数を得やすくなりました。