

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

～今後注目されるNGSアプリケーションのための提案～

○ 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

1) KAPA Library Quantification kit および Sage Science 自動ゲル抽出システム Pippin Prep を用いた、マルチプレックスNGS解析でのデータ量均等化

2) KAPA Library Quantification kit による、長いNGSライブラリーの定量

1) マルチプレックスNGS解析

NGSの技術は既存の分子生物学の集大成のひとつであり一般的なマルチプレックスPCRのコツが重要となる。

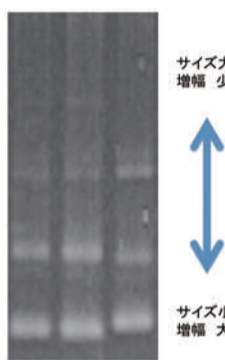
一般的なマルチプレックスPCRを成功させるポイント

- ・プライマーデザイン
- ・各ターゲットサイズの配分
- ・PCR反応組成
- ・PCRサイクル条件
- ・テンプレートDNAのモル比
- ・各プライマーのモル比

マルチプレックスNGS解析で均等なデータ量を得るためのポイント

- ・各ライブラリーのサイズ(平均サイズ、分布)を同等にする
→ライブラリー間のサイズを揃えることで均一な増幅を得る
サイズセレクションにはゲル抽出が効果的
- ・ライブラリーDNAの濃度測定を正確にし、等量混合する
→qPCR法を用いた正確なライブラリー濃度測定が重要！
qPCR測定は、各ライブラリー個別濃度とMix後のトータル濃度の2段階で測定することがポイント

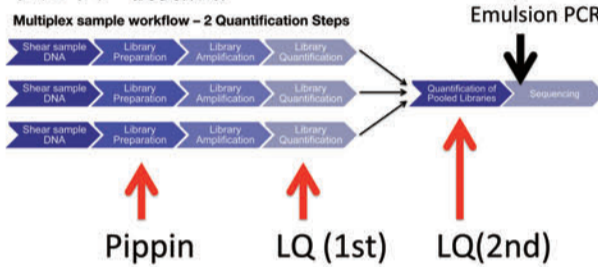
マルチプレックスPCR例
(ゲル電気泳動、3プライマー)



マルチプレックスNGS解析概略



ライブラリー調製概略



Roche 454 Titanium マルチプレックスNGS解析例 (データ提供: 沖縄科学技術大学院大学(OIST) DNAシーケンシングセクション)

プロトコル改良点

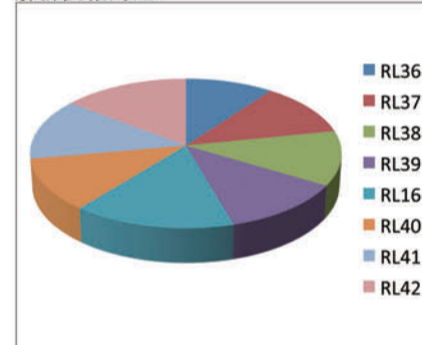
- ・ライブラリーサイズセレクション: 自動化ゲル抽出法
Sage Science Pippin Prep
1.5% Gel, Range mode 600-900bp
- ・ライブラリー定量: qPCR法
KAPA BIOSYSTEMS
KAPA Library Quantification kit



NGS解析結果

	サンプルID	リード数	解析長(bp)	相対比 %
RUN-1	RL36	367436	140,957,921	10.13%
	RL37	425197	162,333,216	11.67%
	RL38	437418	164,142,254	11.80%
	RL39	434700	166,065,446	11.94%
RUN-2	RL16	499037	212,436,508	15.27%
	RL40	370152	158,358,152	11.38%
	RL41	433409	184,379,029	13.25%
	RL42	477129	202,589,274	14.56%

解析長相対比



まとめ

自動化ゲル抽出法によるライブラリーサイズの均一化と、qPCR法でのライブラリー濃度測定で、マルチプレックスNGS解析で、均等なデータ量が得られた。

2) ライブラリーサイズが1kbのライブラリー濃度定量

illumina Ga II x を用いた1kbショットガン・シーケンス例 (データ提供: 沖縄科学技術大学院大学(OIST) DNAシーケンシングセクション)

目的: ライブラリーサイズが大きい場合の、qPCR法によるライブラリー濃度定量の正確性を確認

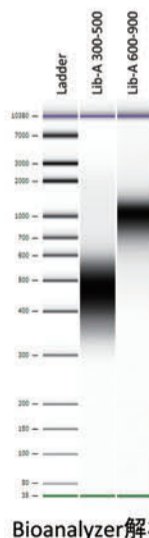
方法: 同一サンプルから、サイズの異なるillumina shotgunライブラリー作成を作成し、それぞれをKAPA Library Quantification kit を用いてライブラリー濃度を定量。各ライブラリーを同一モル数用いて、illumina Ga II xによりNGS解析を行う。

ライブラリー名:

- 1) Lib-A 300-500 (平均サイズ: 470bp)
- 2) Lib-A 600-800 (平均サイズ: 1037bp)

ライブラリー濃度: 最終濃度を10pMで使用

合成クラスター数: 右表参照



NGS結果 (First Cycle report)

	Lane	クラスター数
Lib-A 300-500	1	301,600
	2	301,977
	3	299,258
	4	254,695
Lib-A 600-800	5	291,544
	6	300,538
	7	299,952
	8	300,258

KAPA Library Quantification kit



まとめ

ライブラリー平均サイズが470bpと1037bpのサイズの合成クラスター数(First Cycle report)が、ほぼ一致した。これにより約1kbという大きなライブラリーでも、qPCR法によるライブラリー定量が有効であるということが確認できた。