



Application

ヒト末梢血からのターゲットキャプチャーシーケンスライブラリーの全自動調製

製品名

KAPA HyperPlus Kit (for illumina) (KK8510, KK8512, KK8514)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

製品名

Agencourt Genfind v2 kit (A41499, A41497)
Biomek NXP

メーカー名

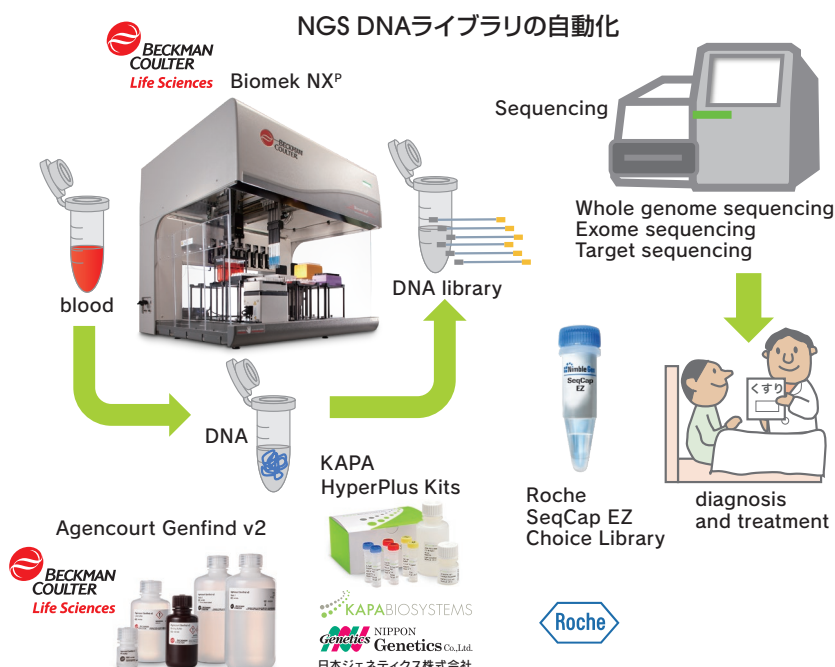
Beckman Coulter

以下のデータにつきましては、金沢大学 医薬保健研究域医学系 革新ゲノム情報学分野 細道一善 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

次世代シーケンサー(NGS)の技術により、大規模なゲノム配列決定が可能となったが、一方で、ゲノム上の特定の領域や遺伝子にターゲットを絞り、多検体を迅速にリシーケンスする需要も多い。実際に、がんや特定の疾患にフォーカスし、NGSを使って関連する遺伝子群を効率よく解析する遺伝子パネルスクリーニングを目的とした製品がすでに数多く販売されている。我々は特定の遺伝子を効率よく解析する手法を発展させ、簡便、迅速かつ安価なゲノム解析技術の開発を進めてきた。エクソーム解析で知られるシーケンスキャプチャー法を基盤とし、多検体をより簡便に解析する手法として最大96検体を同時に解析するプロトコルを確立している。

ここでは、自動分注機 Biomek NX^Pを使用し、Agencourt Genfind v2 kit、Roche SeqCap EZ Choice Library、KAPA HyperPlus kitを用いることにより、血液からNGSのDNAライブラリーを全自動で作製し、ターゲット遺伝子を解析した事例を紹介する。



実験に用いた機器・試薬



KAPABIOSYSTEMS

ライブラリー調製キット
KAPA HyperPlus Kit
Cat.No. KK8510 8回用
Cat.No. KK8512 24回用
Cat.No. KK8514 96回用



BECKMAN COULTER Life Sciences

ゲノムDNA精製キット
Beckman Coulter
Agencourt Genfind v2 kit
Cat.No. A41499 50サンプル分
Cat.No. A41497 384サンプル分
(4×96ウェルプレート)



BECKMAN COULTER Life Sciences

自動分注機
Beckman Coulter
Biomek NX^P



Roche

ターゲットエンリッチメント試薬
Roche SeqCap EZ
Choice Library
Cat.No. 06266282001

Workflow

1. 40 μ Lの血液をGenfind(Agencourt)を用いて精製し、40 μ Lで溶出した
2. 1.で溶出したうち200ngのDNAをFragmentation 37 $^{\circ}$ C,10min
3. EndRepair and A-tailing
4. Adapter Ligation
5. Post Ligation clean up by AMPure
6. Library amplification
7. Post amplification clean up by AMPure
8. Bioanalyzerによるサイズ分布確認
9. Capture
10. Library QC
11. Sequence

Beckman Coulter
Agencourt Genfind v2 kit

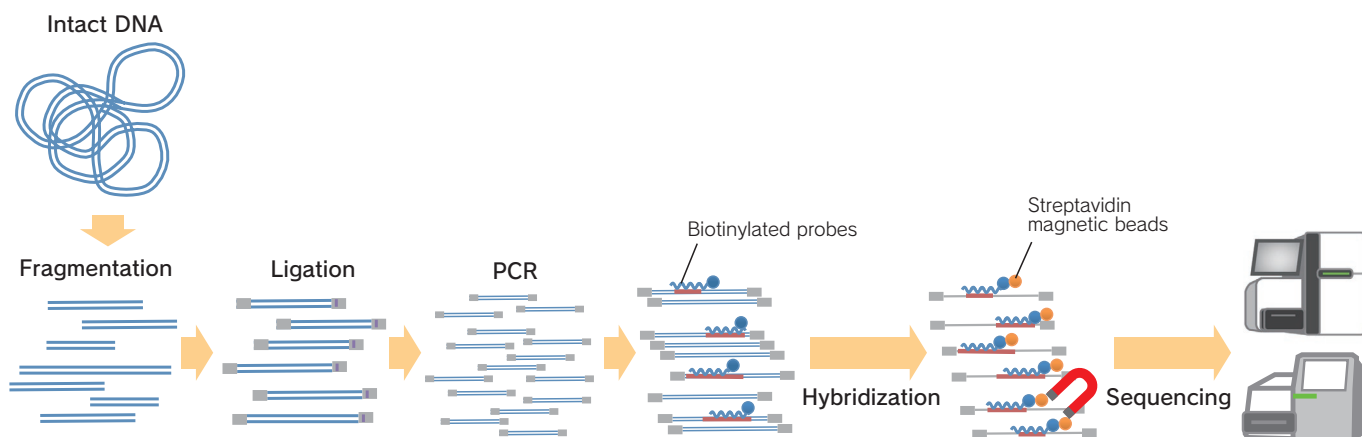
KAPA
HyperPlus kit

Roche
SeqCap EZ Choice Library

Beckman Coulter
Biomek NX^P

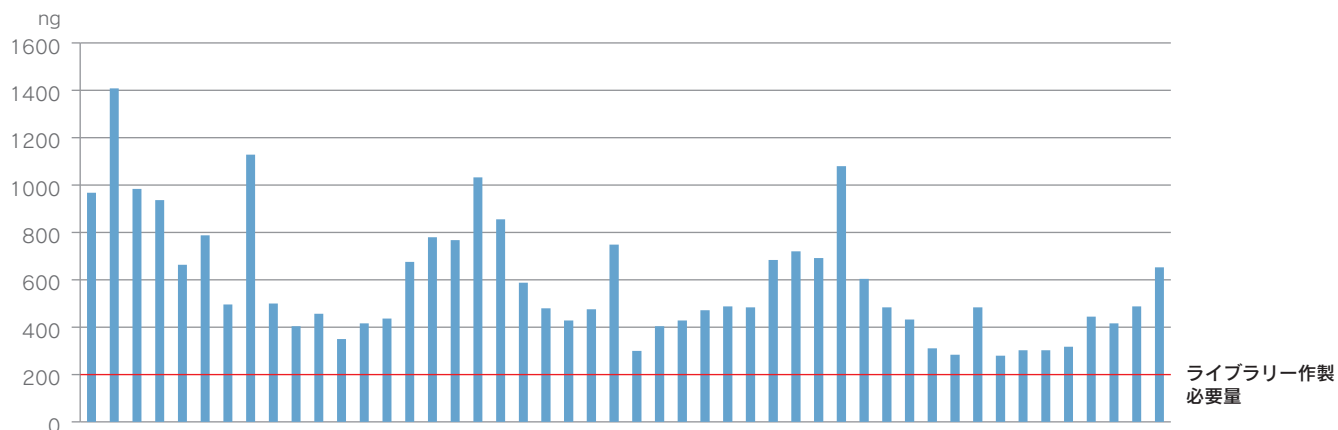
Beckman Coulter
Biomek NX^P

ライブラリ作製のイメージ図



結果

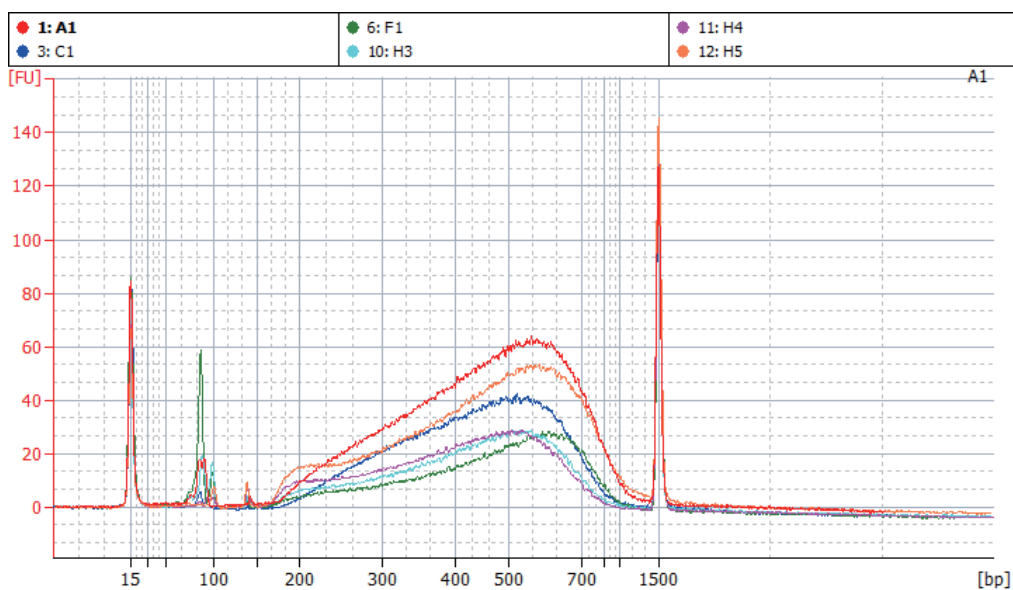
● GenfindによるDNA回収量事例（1ラン48検体の事例）



● まとめ

DNA抽出量のばらつきはあるものの、いずれもライブラリー作製に必要な量以上の収量が回収できた。

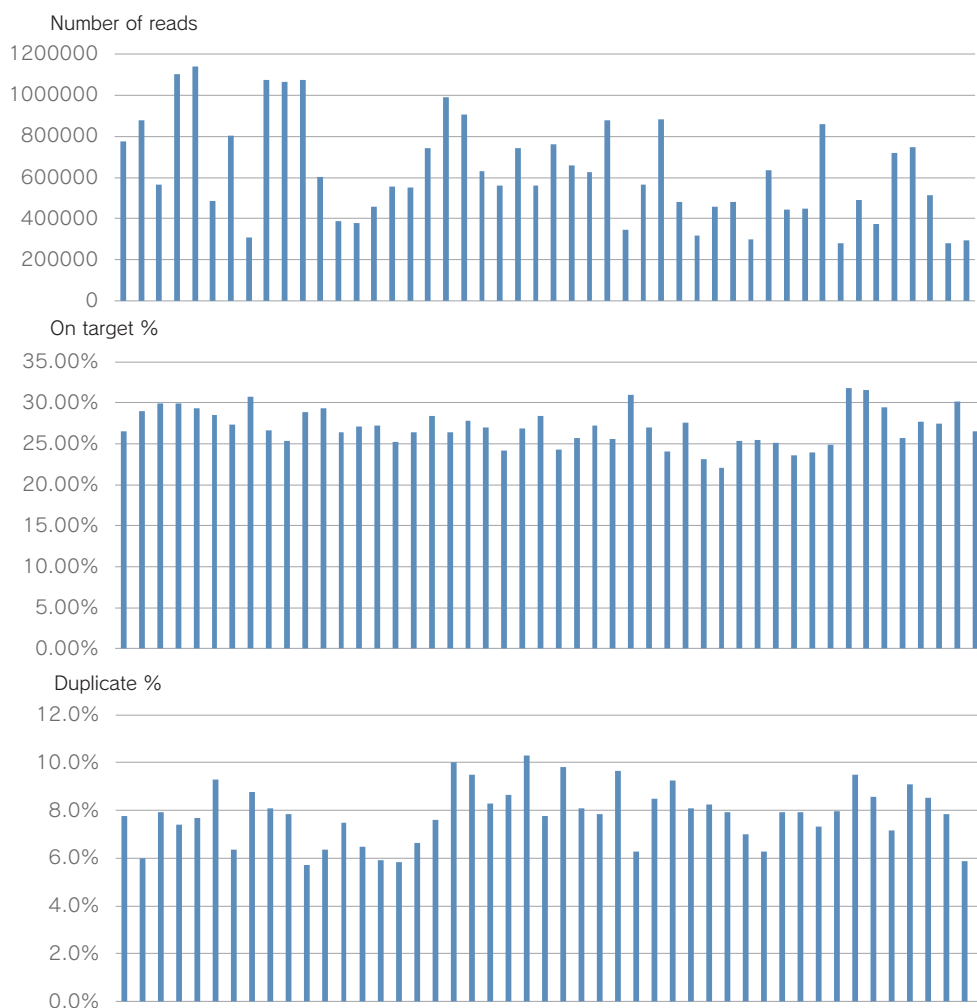
● Bioanalyzerによるサイズ分布確認



● まとめ

KAPA HyperPlus Kitを用いることで、時間と温度により目的サイズへの断片化が示唆された。

● Sequenceの解析結果事例（1ラン48検体の事例）

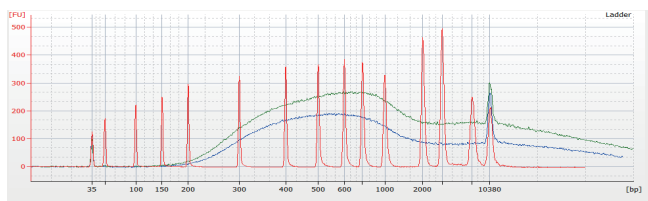


● まとめ

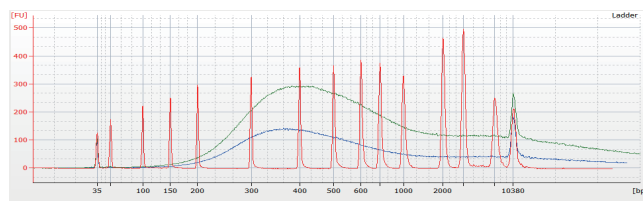
Qubitによる簡易的な濃度測定によりライブラリをプールした結果、リード数のばらつきは認められたが、全てのサンプルで20万リード以上のデータが得られた。

参考データ① KAPA Frag酵素を用いた断片化の評価

KAPA Frag酵素を用いると、Input DNAの量によらず、時間により目的サイズに断片化が可能かどうかの評価を行った。

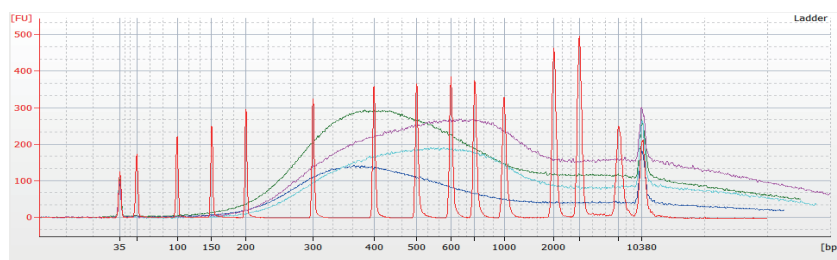


— : 40ng
— : 20ng



— : 40ng
— : 20ng

上記グラフを重ね合わせた結果が下記である。

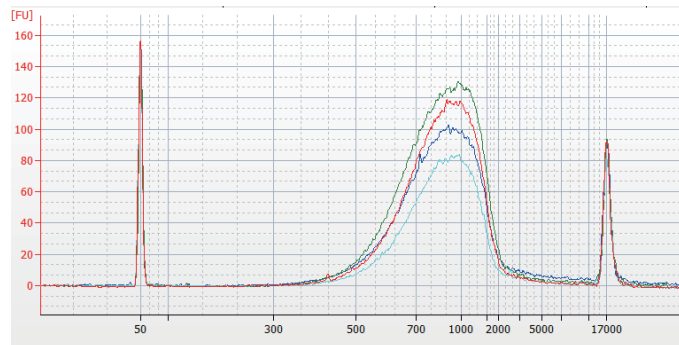


— : 10min 40ng
— : 10min 20ng
— : 5min 40ng
— : 5min 20ng

● まとめ

KAPA HyperPlus Kitを用いると、Input DNA量によらず、時間により目的サイズへの断片化が示唆された。

さらに、サンプル(血液由来DNA)によらず、時間により目的サイズに断片化が可能かどうかの評価を行った。(断片化時間: 5min)



— : Sample K, 5min
— : Sample H, 5min
— : Sample I, 5min
— : Sample T, 5min

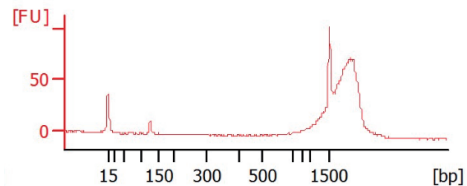
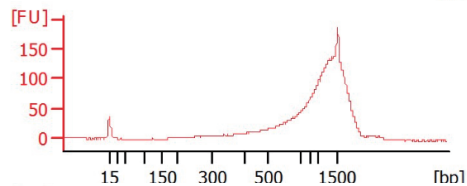
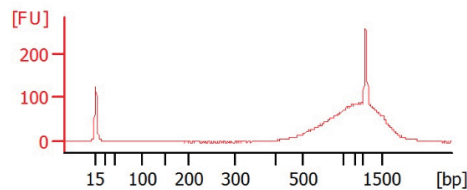
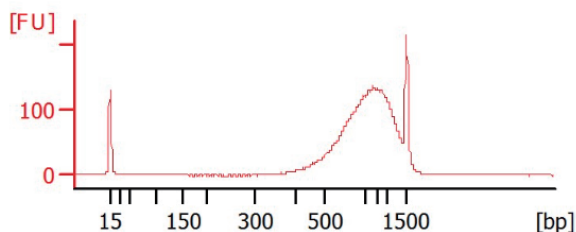
● まとめ

KAPA HyperPlus Kitを用いると、サンプルによらず、時間により目的サイズへの断片化が示唆された。

参考データ② KAPA Frag酵素を使用するときの注意点
● DNA溶液中のEDTA濃度 (断片化時間: 5min)

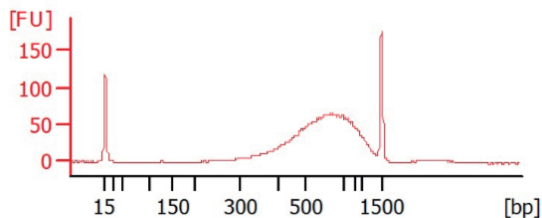
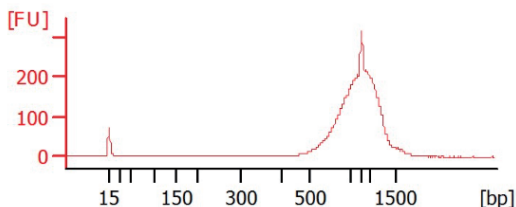
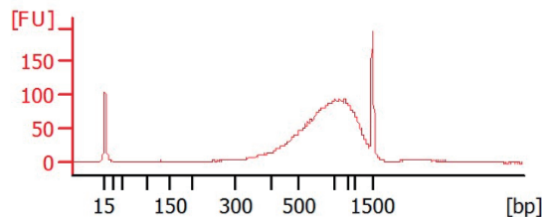
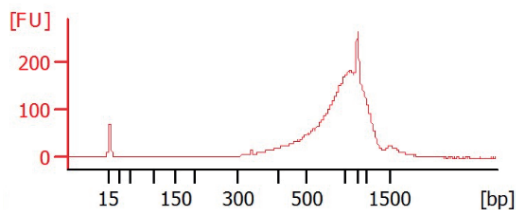
DNA溶液中のEDTA濃度は、KAPA Frag酵素の酵素反応に影響を及ぼす。

例)



断片化前にビーズ精製を行うことで、目的サイズへの断片化が可能となった。

例)



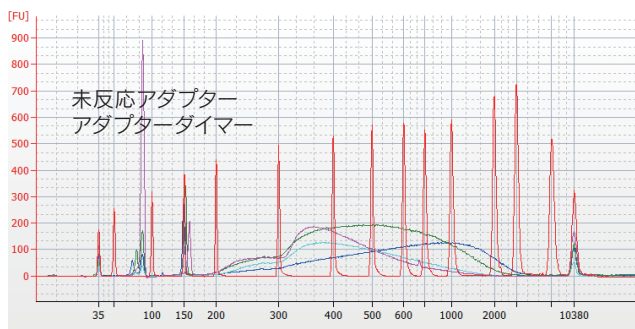
ビーズ精製の反応組成
 DNA+H₂O 10μL
 AMPure XP 10μL

● まとめ

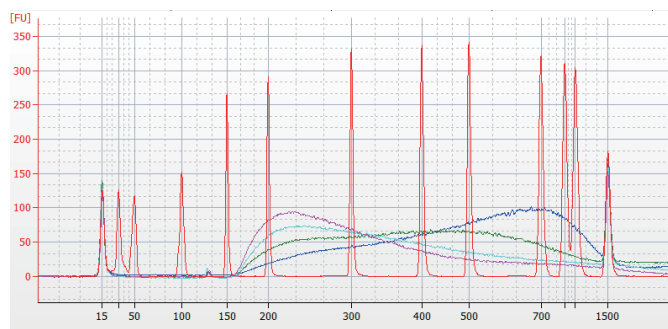
DNA溶液中のEDTA濃度は、KAPA Frag酵素の酵素反応に影響を及ぼす、EDTA濃度が不明だったため、断片化前にビーズ精製を行うことで、目的サイズへの断片化が可能となった。

● 断片化後の増幅前後のサイズ分布確認

次に、断片化後、ライゲーション反応まで行ったサンプル、およびライゲーション反応後、増幅まで行ったサンプルのサイズ分布を確認した。



— : 5min — : 15min
 — : 10min — : 20min



— : 5min — : 15min
 — : 10min — : 20min

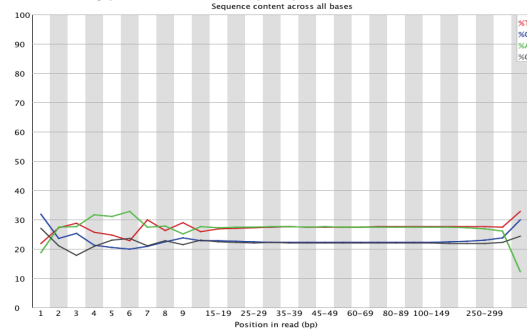
● まとめ

アダプターがY字構造のためライゲーション後には、目的サイズよりも大きいサイズの位置にピークが検出される傾向があるが、増幅することで、目的サイズの位置にピークが検出されることが示唆された。

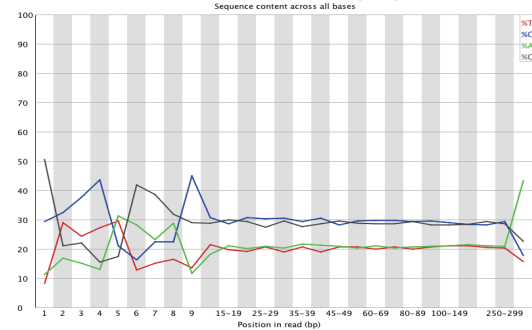
参考データ③ シーケンスによる読み始めの配列の評価

シーケンスデータからの断片化バイアスの評価

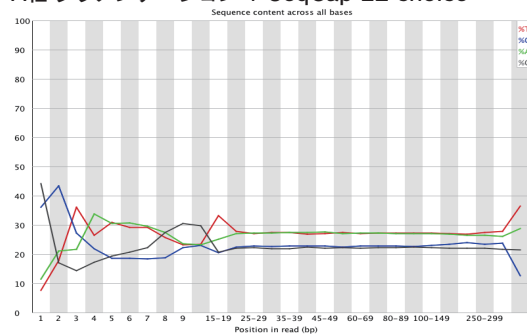
KAPA HyperPlus + SeqCap EZ Choice



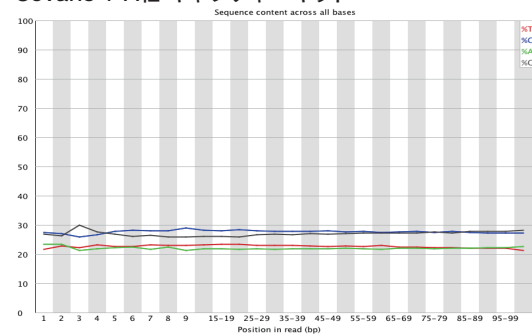
I社 タグメンテーションキット + SeqCap EZ Choice



A社 タグメンテーション + SeqCap EZ choice



Covaris + A社 キャプチャーキット



● まとめ

KAPA HyperPlus Kitを用いると、他社断片化酵素と比較して、読み初めの配列の偏りが低く、Covarisと比較しても遜色ない結果が得られることがわかった。

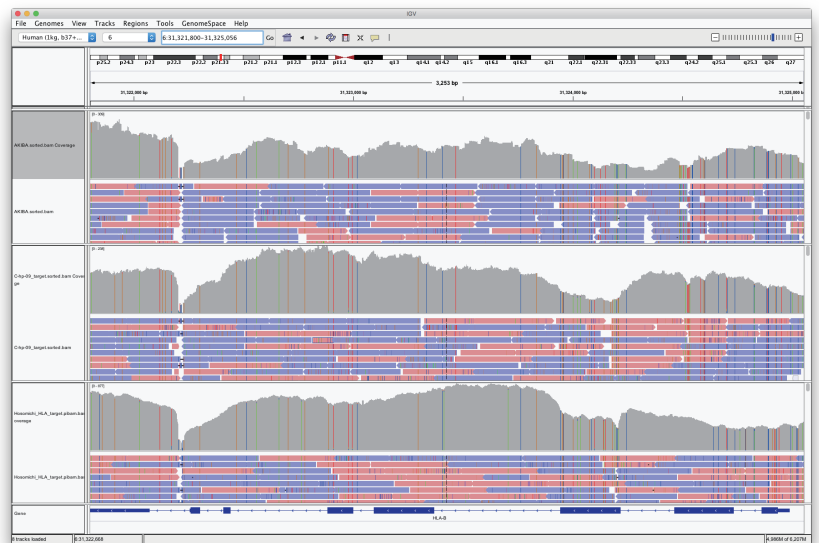
参考データ④ シーケンスによるGCバイアスの評価

GC バイアス

Covaris + A社 キャプチャーキット

A社 タグメンテーションキット + SeqCap EZ Choice

KAPA HyperPlus + SeqCap EZ Choice



● まとめ

既存の手法に比べるとGCの高い領域でのdepthの低下が僅かに抑えられていた。