



KAPA HyperPlus / SeqCap EZ ワークフロー FFPE DNA のターゲット次世代シーケンシングでの データ品質と所要時間の改善

Authors

Maryke Appel
Technical Director

Kapa Biosystems
Wilmington, MA, USA

Brian Walker
Senior Scientist

Thomas Jones
Scientist

Elisa Izquierdo Delgado
Scientist

Centre for Molecular Pathology
Royal Marsden Hospital
London, UK

Denise Raterman
R & D Scientist

Heidi Rosenbaum
R & D Scientist

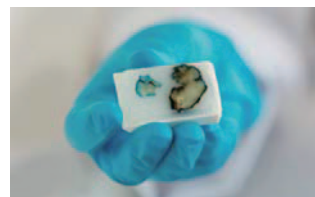
Daniel Burgess
Director of Development

Roche NimbleGen
Madison, WI, USA

ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE) 組織は、癌ゲノム研究と臨床診断学において重要なDNA供給源となっています。Illumina®プラットフォームで、FFPE DNAのハイスループットターゲット次世代シーケンシングを行う上での大きい課題は、サクセスレートが予測可能で品質にばらつきがある検体を、他の方法より短い所要時間で処理する能力です。酵素断片化を含むKAPA HyperPlus Kitにより、SeqCap™ EZ Target Enrichment (ターゲット濃縮) ワークフローは能率化され、Covaris®法で断片化されたDNAから作られるライブラリーと同等以上の品質を持つライブラリーが調製されます。

序文

臨床環境では、シーケンシング (配列決定) のサクセスレートと所要時間の改善が、患者のケアに大きく影響することがあります。英国のロイヤルマーズデン病院 (the Royal Marsden Hospital) の分子病理学センターでは以前、ターゲットシーケンシングワークフロー (カスタムのRoche® NimbleGen™ SeqCap EZ*キャプチャーパネルを使用) で、ライブラリー構築にKAPA Hyper Prep Kitを採用しました。高効率のKAPA Hyper Prepの化学的性質と能率化されたプロトコルにより、ライブラリー調製時間が短縮され、一貫したサクセスレートでシーケンシングが可能なFFPE検体のプールが拡大されました。



DNAの機械的断片化は、依然として主要なボトルネックでした。同センターが所有するDNA断片化装置 Covaris Mシリーズを使用しても、この断片化は時間と手間がかかるプロセスであり、スケール調整も自動化もできません。現時点では、酵素断片化ソリューション (タグメンテーション (tagmentation) に基づいた方法を含む) は、DNAインプットと品質に関して安定しているとは立証されておらず、断片化と増幅のバイアスの問題があるため、低頻度の突然変異体の確実な検出に必要なcoverage depthの獲得が困難になっています¹。

本研究では、Kapa Biosystems社のKAPA HyperPlus Kitの評価を実施しました。本キットは、シングルチューブで酵素DNA断片化とライブラリー構築が可能になります。統合プロトコルは、スケール調整と自動化が容易になるだけでなく、Covarisチューブからの断片化DNAの物理的移動に伴うインプットDNAの損失をなくします。これにより、ライブラリー配列の多様性とsequence coverage全体をさらに改善することが可能になります。消化管 (gastrointestinal : GI) 癌に関連した42種の遺伝子の領域をターゲットとするFOR-MAT法により実証実験を実施し、この実験結果から、酵素断片化を含むKAPA HyperPlusワークフローが、Covaris法で断片化されたDNAからKAPA Hyper Prep Kitで調製されたライブラリーと同等以上のライブラリーを調製することが確認されました。GIアッセイで使用されるキャプチャーライブラリーを最適化することにより、KAPA HyperPlus/SeqCap EZワークフローがさらに改善されました。ハイブリダイゼーションの2巡目をなくすことにより、coverage depthを犠牲にすることなく、所要時間が大幅に短縮されました。



The ROYAL MARSDEN



材料と方法

実験計画

Covaris®断片化を使用した実証済みのライブラリー構築ワークフローを、酵素断片化を使用した新しいワークフローと対比させて、FFPEと末梢血から3つのペアード (paired) DNA検体を同時処理しました。シーケンシングデータを、次の重要な評価基準に関して比較しました： (i) 重複率 (%), (ii) 特有のオンターゲットリードの割合 (%), (iii) 100X, 250X, 中位深度でのcoverage, (iv) 5%以上の頻度での変異体の検出。

ライブラリーの構築

FFPE DNA (200 ng) 又は非腫瘍血液DNA (50 ng) は、Covaris M220装置を使用して、150 ~ 200 bpのモードサイズに断片化しました。ライブラリーは、実証済みのプロトコル²に従って、KAPA Hyper Prep Kit (Kapa Biosystems社) とバーコード付きSeqCap EZアダプター (Roche® NimbleGen™) で調製しました。このプロトコルには、ライゲーション後のデュアルSPRI®サイズセレクションと、KAPA HiFi HotStart ReadyMix (FFPEは8サイクル、ペアードノーマルコントロールは7サイクル) を使用したキャプチャー前の増幅が規定されています。これに平行して、同様の方法で同一検体からライブラリーを調製しましたが、この場合は、KAPA HyperPlus Kitを使用し、酵素断片化を37°Cで30分間行っています^{3, 4}。キャプチャー前の増幅は、両方の検体種別について6サイクルに減りました。ポジティブコントロールのライブラリーは、50 ngの男性コントロールDNA (Promega社) から調製し、ネガティブコントロールのライブラリーはインプットDNAなしで調製しました。

ターゲットキャプチャー

キャプチャー前ライブラリーはQubit™ (ThermoFisher社) で定量化し、その後、FORMATパネル (約200 kb) を使用してマルチプレックスターゲット濃縮のためのプールを調製しました。各プールは、1 μgのライブラリー DNAからなり、単一の種別 (FFPE又は血液) について5つのライブラリーにほぼ均等に分割しました。ポジティブコントロール (20 ng) とNTC (no template control) (~0ng) ライブラリーが、FFPEプールに含まれています。ハイブリダイゼーション反応 (プール当たり1つ) は、実証済みのプロトコルに従って、SeqCap EZ試薬を使用して行いました²。元のGIパネルを使用して、オーバーナイトのハイブリダイゼーション (47°Cで16時間以上) とキャプチャーを2巡実施し⁵、1巡後のKAPA HiFiを使用した増幅は5サイクル、キャプチャーの後増幅は11サイクルでした。

シーケンシングとデータ解析

濃縮された最終的なライブラリープールは、KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems社) を使用してqPCRにより定量化しました。各プールを4 nMに希釈し、その後、腫瘍プールと正常プールを4:1の比で組み合わせ、変性させてから、Illumina®

MiSeq®装置にロードしました。Paired-endシーケンシング (2 × 150 bp) の実施には、MiSeq v3 chemistryキット (Illumina社) を使用しました。データ処理に使用した標準化分析パイプラインでは、初期データ処理と出力についてはMiSeq Reporterを、重複排除とシーケンシング評価基準の作成にはPicardを使用しています。リードはヒトの参照ゲノムhg19に対してアライメントしました。変異体解析はIllumina VariantStudio v2.2を使用して実施し、転座の判定にはMantaを使用しました。

最適化キャプチャーパネルを使用した検体調製とシーケンシング

GIパネルのバージョン2をRoche NimbleGenで作成しました。ライブラリーの調製には、新しいKAPA HyperPlusワークフローを使用しました³。ターゲット濃縮は上記のとおり実施。ただし、ハイブリダイゼーションとキャプチャーの2巡目 (及び、濃縮の1巡目後のライブラリー増幅) を除く、SeqCap EZ Library SRのユーザーガイドに記載されているシングルキャプチャープロトコルに復帰しています⁶。

結果

実証済みのKAPA Hyper Prep/SeqCap EZワークフローを、酵素DNA断片化を使用したKAPA HyperPlus/SeqCap EZワークフローに対比させて、Covaris法で断片化されたDNAから調製したライブラリーについて、比較対象となるシーケンシング (図1) とcoverage (図2) 評価基準を次のページに示します。これらの評価基準を選択した理由は、ライブラリー品質とシーケンシング能力の利用度を反映しているからです。

KAPA HyperPlusワークフローは、5つの評価基準すべてで既存のワークフローより優れており、FFPE検体で著しい改善が見られました。KAPA HyperPlus Kitは、プロセス上のボトルネックをなくすだけでなく、(同量のシーケンシングから) FFPE検体でのcoverage depthを大幅に向上することができました。このキットは、低頻度の体細胞変異の正確な検出に不可欠なものです。

KAPA HyperPlus/SeqCap EZワークフローを実証するための最終要件は、新しいワークフローで調製されたライブラリーにおいて、5%以上の頻度での配列変異体の検出を、Covaris断片化を使用した既存のプロトコルに対して比較することでした。この比較の結果を図3に示します。6つのライブラリーのそれぞれについて、無作為に選んだ個数の染色体位置についてデータを調べ、ヒトの参照ゲノムhg19に対する変異体頻度 (%) を計算しました。2つの方法の相関の範囲は、3つのFFPEライブラリーでは96.7~99.6%、血液DNAから調製した3つのライブラリーでは98.1~99.8%でした。これにより、HyperPlusワークフローで作られたライブラリーが、実証済みのプロトコルを使用して作られたライブラリーと機能的には同等であることが確認されました。

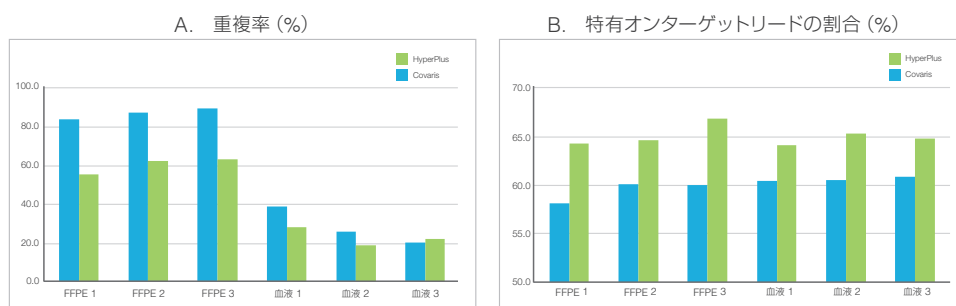


図1. シーケンシングの比較評価基準

- A) HyperPlusワークフローで調製したライブラリーの大多数では、重複率が低くなりました。FFPEライブラリーの平均重複率 (60.0%) は、元のプロトコルより26.3%減少しました。元々、重複率が低い高品質の血液検体では、予想どおり、平均重複率の向上 (23.0% vs. 27.8%) が小さいものでした。
- B) すべてのライブラリーについて、また、両方の検体種別について、一貫したオンターゲットリードの割合が得られました。HyperPlusワークフローの場合、特有オンターゲットリードの割合の平均値は、FFPEライブラリーとペアード正常ライブラリーについてそれぞれ、65.3%と64.7%でした。これは、元のプロトコルに対する5.9%と4.1%の向上と同等です。

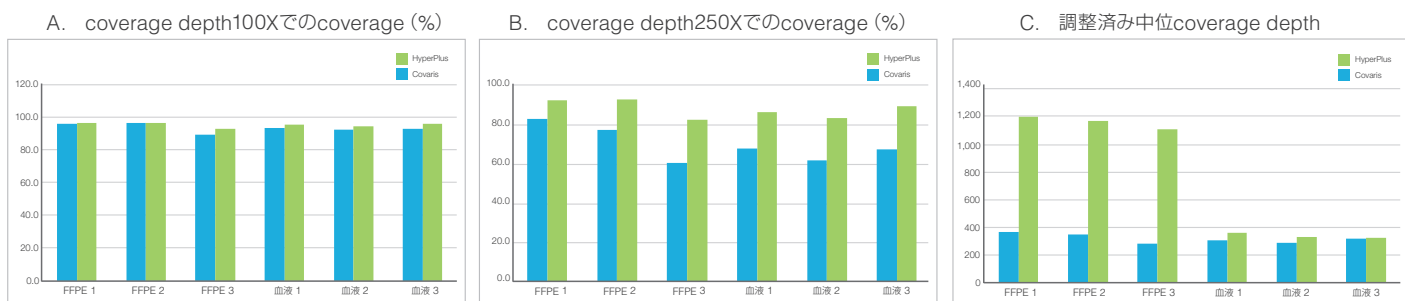


図2. coverageの比較評価基準

- A) coverage depth100Xでのcoverageは、プロトコルと検体種別の両方で高く、同等でした。
- B) coverage depthが大きくなると (250X)、KAPA HyperPlusワークフローの方が、元のプロトコルよりcoverageが高くなりました。HyperPlusでは、250Xでの平均coverageは、FFPEとペアードコントロールについて、それぞれ89.2%と86.2%でした。これに対し、Covaris®断片化を使用した元のプロトコルでは、73.7%と65.7%でした。
- C) coverageは、シーケンシングプール中のライブラリーごとに得られるリードの数の影響を受けるため、リードの数が全ライブラリーで等しかった場合、2つのプロトコル間の中位coverageの差を反映するように、検体ごとの計算値を調整しました。FFPE検体について、HyperPlusワークフローで得られた平均中位coverage depth (1,154X) は、既存のプロトコルでの平均中位coverage depth (328X) より3.5倍、向上しています。ペアード血液検体の場合は、平均中位coverage depthの差はかなり小さいものでした (Covarisプロトコルでの302Xに対して、HyperPlusでは333X。すなわち、1.1倍の向上)。

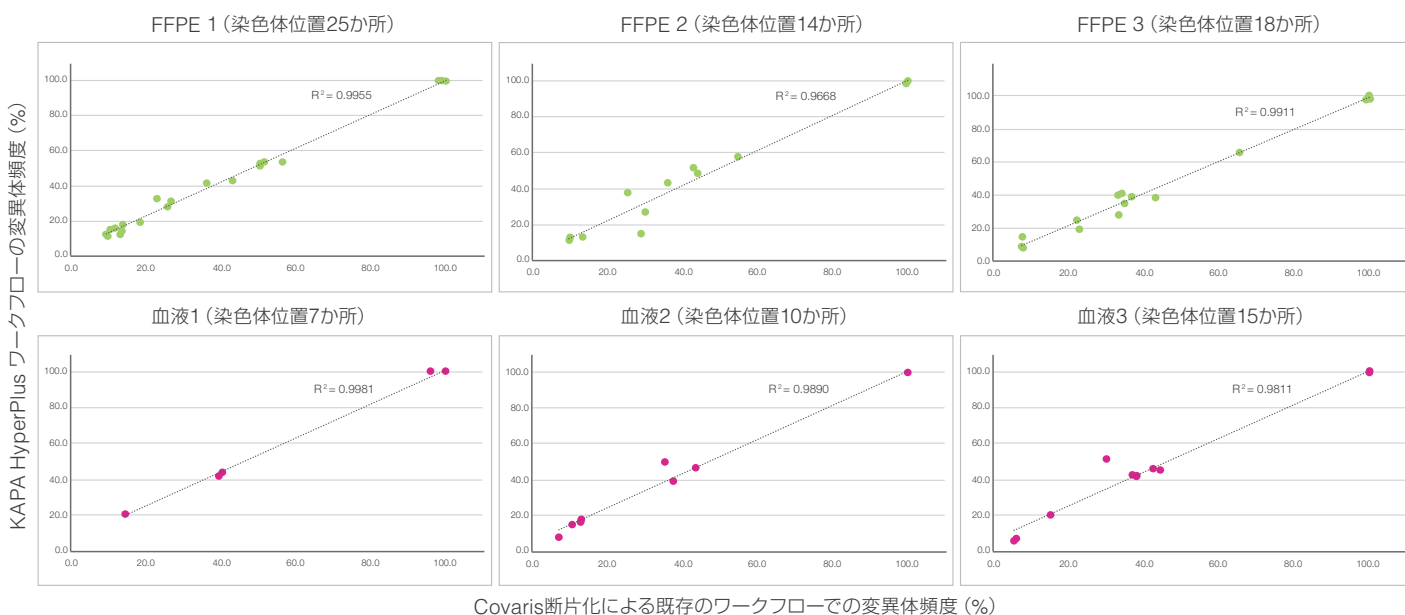


図3. 変異体検出の相関

3つのFFPE (腫瘍) ライブラリー (上段) と、そのペアード正常ライブラリー (末梢血DNAから調製。下段) のそれぞれについて、5 ~ 100%の変異体頻度の予測値により、選ばれた数の染色体位置での変異体頻度 (ヒトの参照ゲノムhg19に対比) を計算しました。各データ点は、既存のワークフロー (x軸) をKAPA HyperPlus ワークフロー (y軸) に対比させて求めた、変異体頻度の計算値 (%) を表しています。回帰分析はMicrosoft® Excelで実行しました。

Covaris®断片化をやめると、ライブラリー調製時間（断片化からキャプチャー前ライブラリーまで）は約30%短縮されました。しかし、組織から配列データまでの総所要時間（データ解析を除いて約76時間）のうちの大部分（48時間）は、依然として、「ダブルキャプチャー」プロトコルに占められています。このプロトコルは、小さくて困難なキャプチャーパネルに有利なことが示されています⁵。消化管癌のターゲットライブラリーを、これまでに包括が不十分であった領域へのプローブの追加と、非特異領域からのプローブの除去により最適化する

ことにより、ハイブリダイゼーションとキャプチャーの2巡目と、2巡間の5サイクルの増幅を排除することができました。これにより、時間が大幅に削減（1日間）され、重複率がさらに低下しました（図4のA）。予測されるとおり、小さいパネルを使用したキャプチャーの1巡では、オンターゲット率（非表示）が低下しますが、パネルの最適化によって、より一様なcoverageが得られるため、平均coverage depthは同様のままでした（図4のB）。

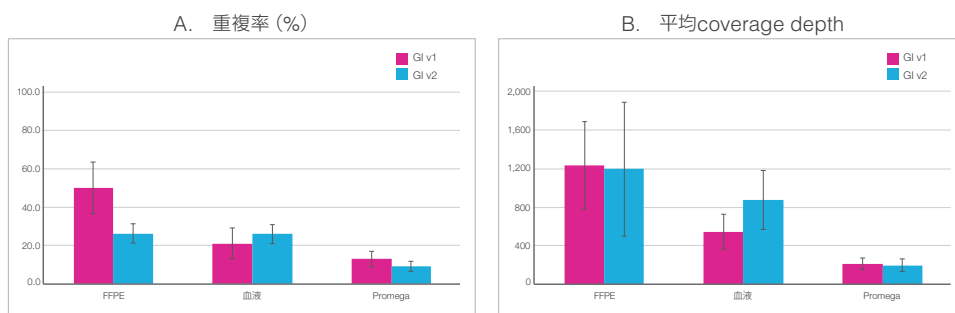


図4. 最適化キャプチャーパネルとキャプチャープロトコルを使用して調製されるライブラリーのために精選された評価基準

重複率A) は一般的に、最適化パネルと、ライブラリー増幅が少ないプロトコルでは低くなりました。FFPE検体では、ハイブリダイゼーションとキャプチャーの2巡目をやめても、平均coverage depthB) に有意な影響はありませんでした。

元のFOrMAT GI癌パネル (GI v1) とダブルキャプチャープロトコルを使用したMiSeq®ラン7回と、最適化パネル (GI v2) とシングルキャプチャープロトコルを使用したMiSeqラン3回の平均値を、データは表しています。各データセットの個々の検体の総数は次のとおり：GI v1 — FFPE (腫瘍)=37、血液 (正常)=28、Promegaポジティブコントロール=7 (MiSeqラン当たり1)。GI v2 — FFPE (腫瘍)=14、血液 (正常)=4、Promegaポジティブコントロール=3。

結論

カスタムの小さいSeqCap EZターゲット濃縮パネルを使用した、ターゲットシーケンシングアッセイでKAPA HyperPlus Kitを採用することにより、所要時間とFFPEライブラリーの品質の両方を大幅に改善することが可能になりました。ロバストでシングルチューブ対応で低バイアスのHyperPlusの化学的性質により、機械的断片化が不要になり、ライブラリー構築の効率向上によるキャプチャーワークフローの能率化が可能になります。全般的には、検体調製時間（組織から配列の生データまで。解析を除く）が約30%短縮され、同時に、ライブラリー配列の多様性とcoverage depthが向上しました。

REFERENCES

1. Miller B, et al. (2015). KAPA HyperPlus—A Single-tube NGS Library Prep Workflow Integrating Enzymatic Fragmentation Results in High Yields and Low Sequencing Bias. Kapa Biosystems Poster A064.
2. Walker B (2015). Covaris Targeted Capture of DNA Using KAPA Hyper Prep Kit and NimbleGen™ Baits, version 1.0. Royal Marsden index number SMD72.
3. Walker B (2015). Targeted Capture of DNA Using KAPA HyperPlus Kit and NimbleGen Baits, version 2.0. Royal Marsden index number SMD74.
4. KAPA HyperPlus Technical Data Sheet. Kapa Biosystems document number KR1145.
5. Burgess D, et al. (2012). Double Capture: An Alternative Protocol for Sequence Capture of Difficult Targets. Roche® NimbleGen Technical Note 06870406 001.
6. SeqCap EZ Library SR User's Guide, v5.0 (2014). Roche NimbleGen document number 06588786 001.