

NGS 情報便

おまとめ号
No.1

2020年2月発行:タカラバイオ株式会社NGS試薬チーム

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をまとめてお届けします。

見逃した情報をこれでチェック！ NGS情報便 vol.1～9を一冊にまとめました。

【内容】

vol. 1

PicoPLEX® Gold Single Cell DNA-Seq Kitを用いた5細胞からのSNVとCNVの同時解析

vol. 2

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した少量細胞(10,000細胞)からの安定したChIP-Seq解析手法の確立

vol. 3

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した微量検体からの確実な菌叢解析 (ショットガンメタゲノムシーケンス)

vol. 4

分子バーコード付きライブラリー調製キットThruPLEX® Tag-seq Kitの使用で、cell free DNAで低頻度変異解析を実現

vol. 5

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した、ネッタイツメガエル初期胚で発現する発生制御因子に対するChIP-Seq解析手法の確立

vol. 6

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した出芽酵母のDMS-Seq解析

vol. 7

セルソーターを用いたシングルセルRNA-Seq実験を成功させるための5つのTips

vol. 8

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した、FFPE DNAサンプルのNGS解析

vol. 9

SMART-Seq® Stranded Kitを使用した腫瘍細胞のシングルセルRNA-Seq解析



次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.1のポイント: タカラバイオの、イルミナ社NGS装置用全ゲノム増幅&ライブラリー調製キットを使うことで、一度のシーケンスでSNVとCNVの同時解析が可能になりました。

【キーワード】 全ゲノム増幅(WGA)、少数細胞、一塩基変異(SNV)解析、コピー数多型(CNV)解析

PicoPLEX® Gold Single Cell DNA-Seq Kitを用いた5細胞からのSNVとCNVの同時解析

(クローンテック取得データ)

■ 実験の背景

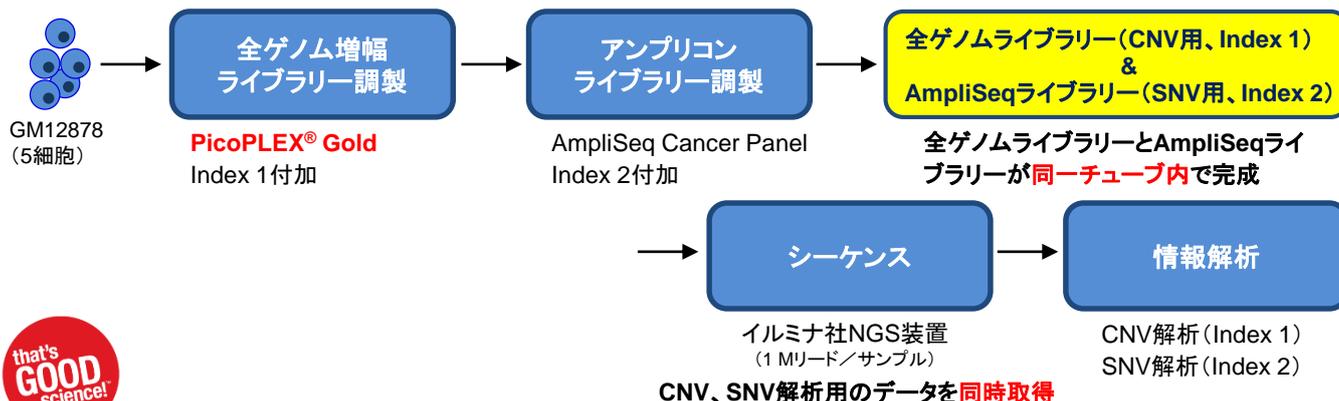
臨床サンプルのゲノム解析はDNA量が少ないことが多いため、特にシングルセル解析はがんなどの病気の分子メカニズムを解明するためには重要である。正確性の高い一塩基変異(single nucleotide variants: SNV)解析と再現性の高いコピー数多型(copy number variation: CNV)解析が求められているが、全ゲノムシーケンスによるSNV解析はシーケンス量が多くコストが高くなるため、ターゲットシーケンスが好まれている。一方、CNV解析のシーケンス量はSNV解析より少ないが、全ゲノムを解析する必要があるため、SNVとCNVを解析するためには従来おのおの個別のライブラリーを作製する必要があった。本実験ではシングルセルからの全ゲノム増幅とライブラリー調製が可能なPicoPLEX® Gold Single Cell DNA-Seq Kitとターゲットシーケンスが可能なAmpliSeq for Illumina Cancer Hotspot Panel v2(イルミナ社)を組み合わせることで、全ゲノムとターゲットシーケンス用のライブラリーを同時に作製することができ、かつ1回のシーケンスでSNV、CNV解析を同時に行うことが可能となった。

■ 使用製品: シングルセルからでも均一な全ゲノム増幅が可能なライブラリー調製キット

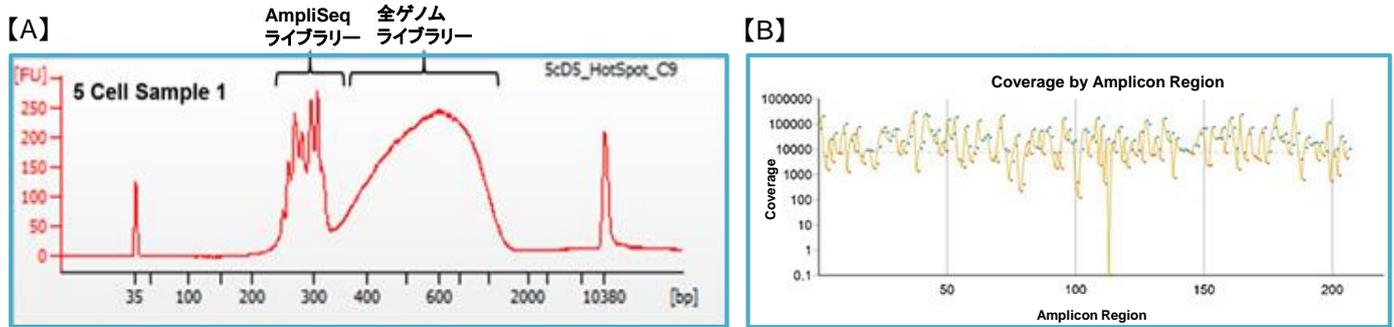
製品名	容量	製品コード	価格
PicoPLEX® Gold Single Cell DNA-Seq Kit	24回	R300669	¥134,000

※別途Index Kitが必要です。

■ 実験ワークフロー



■ ライブラリーの電気泳動(バイオアナライザ)結果【A】とアンプリコンカバレッジ深度【B】



【A】 PicoPLEX® GoldとAmpliSeqを組み合わせて作製したライブラリーの電気泳動結果は、**全ゲノムライブラリーとAmpliSeqライブラリーの両方が含まれたサイズパターン**となり、予想通りの結果が得られた。

【B】 設計された207個のアンプリコンのうち206個が検出され、いずれも100x以上の深度でカバーされた。**PicoPLEX® Goldによる全ゲノム増幅はゲノムカバー率が高いことが示された。**

■ SNV解析結果

	True positives*	% True positives	Allele dropouts**	False positives***	% False positives
Reference	11	100	0	0	0
Sample 1	11	100	0	1	4.5x10 ⁻³
Sample 2	11	100	0	1	4.5x10 ⁻³

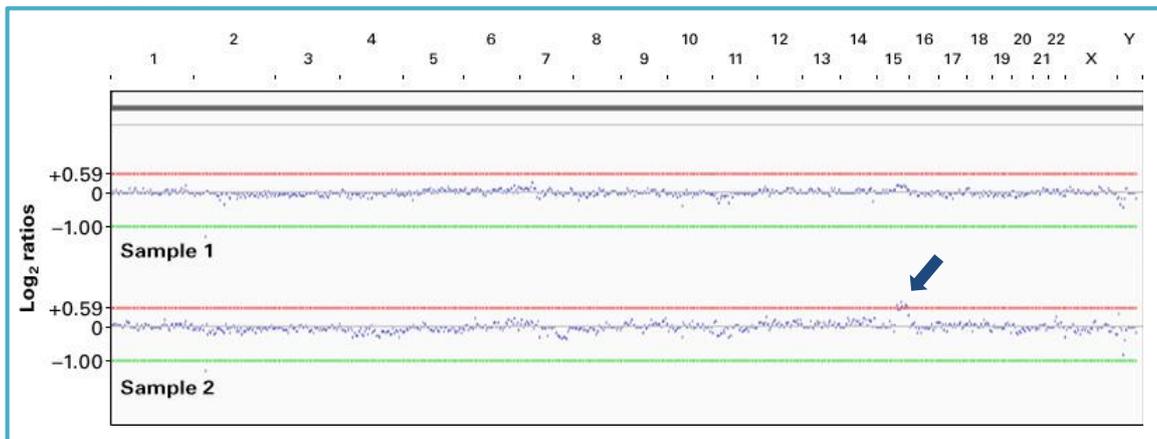
* For the GM12878 cell line, there were eleven variants contained in the Hot-Spot Cancer Panel.

** Filters: Minor allele frequency >0.3, Variant depth >10

*** Total panel size=22 kb

本実験で使用したGM12878細胞は使用したAmpliSeqパネル中に11個の変異が存在するが、5細胞を用いた反復実験 (Sample 1, 2) では11個すべての変異を検出することができた。偽陽性は1個検出されたが、アレルドロップアウトは検出されず、**5細胞からでも精度良くSNVを検出できることが示された。**

■ CNV解析結果



本実験で使用したGM12878細胞は本来、コピー数異常がない細胞だが、培養を重ねるとコピー数異常が検出されることがよくある。本実験ではSample 2のみにおいて、15番染色体でコピー数異常が検出され(青矢印)、CNV解析も精度良く検出できることが示され、**一度のシーケンスでSNV、CNVの同時解析が可能であることが示された。**

NGSニ情報 ① ▶▶▶

低価格・簡便操作の全長mRNA解析 (シングルセル or 超微量)

SMART-Seq® HT Kit

(製品コード 634455 容量 12回 価格 ¥80,000)



次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.2のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、微量なChIPサンプルからでもサンプル量が多い場合と遜色のない解析結果が得られました。

【キーワード】 ChIP-Seq、クロマチン免疫沈降、少数細胞、少量サンプル、イルミナ社NGS装置

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した少量細胞(10,000細胞)からの安定したChIP-Seq解析手法の確立

(データご提供: 東京大学 定量生命科学研究所 白髭先生、坂東先生)

■ 実験の背景

ChIP(クロマチン免疫沈降)は、目的タンパク質が結合している染色体領域を免疫沈降により濃縮する技術で、その領域を次世代シーケンス(NGS)で網羅的な解析を行う手法がChIP-Seq解析である。ChIP-Seq解析はエピジェネティクスの研究を行うために必要不可欠な技術となっているが、使用する細胞が少なくChIPにより回収されるDNA量が非常に少ない場合があり、微量サンプルから高感度なNGS解析を可能にする技術の確立は重要な課題の一つであった。

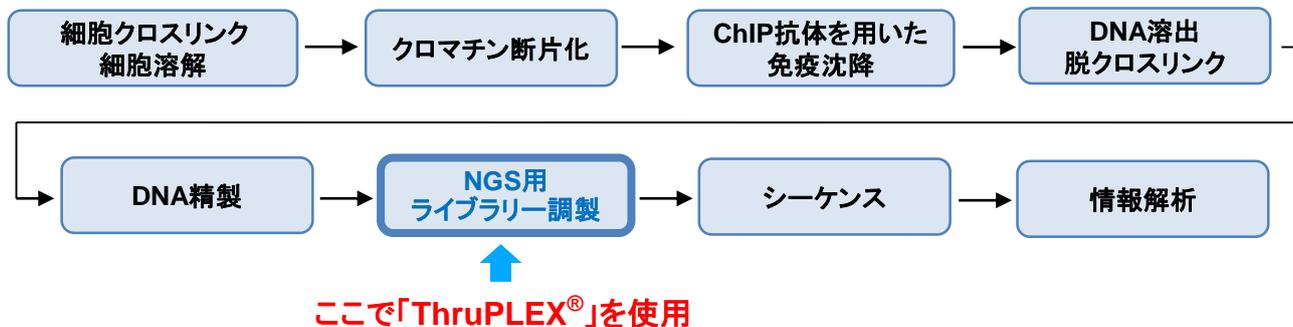
そこで我々は、クロマチン断片化手法の最適化とタカラバイオのThruPLEX® DNA-Seq Kitによるライブラリー化により、ChIP-Seq解析の微量化プロトコールをほぼ固定できた。

■ 使用製品: わずか50 pgのDNAからでも高品質ライブラリーが調製可能なキット

製品名	容量	製品コード	価格
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000

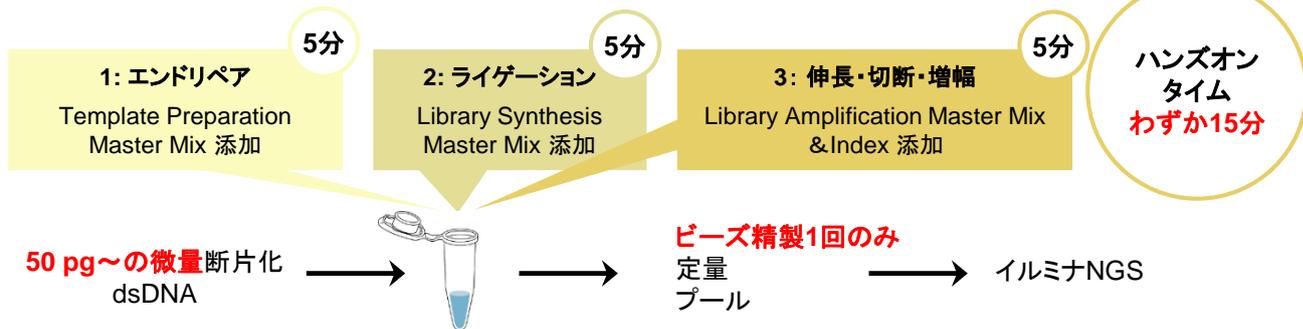
※別途Index Kitが必要です。Indexについては4ページをご覧ください。

■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



NGS試薬担当が、詳しい製品説明にお伺いいたします。ご希望の方は弊社営業担当、もしくは弊社試薬販売店までお気軽にお声かけください。

■ ThruPLEX®の操作ステップ： シンプルなステップで操作ストレスとサンプルロスを減らし、手技によるバラツキを抑えます。



■ マッピング結果

サンプル	総リード数	マップされたリード数 (%)	マップされなかったリード数 (%)	PCRバイアス (duplicate)
Input	31,400,938	24,696,740 (78.7%)	3,087,220 (9.8%)	3,616,978 (11.5%)
1 × 10 ⁴ 細胞 (H3K4me3)	30,823,404	21,336,878 (69.2%)	6,697,451 (21.7%)	2,789,075 (9.1%)
2.5 × 10 ⁵ 細胞 (H3K4me3)	45,738,702	37,730,704 (82.5%)	4,018,338 (8.8%)	3,989,660 (8.7%)

1 × 10⁴個または2.5 × 10⁵個のRPE細胞から、H3K4me3抗体を用いて免疫沈降してChIP DNAサンプルを取得した。免疫沈降しなかった細胞をInputサンプルとした。その後、ChIP DNAサンプルの全量を用いてThruPLEX® DNA-Seq Kitでライブラリーを作製し、シーケンス解析した。

少数細胞の1 × 10⁴個の場合でもduplicate率は9.1%となり、細胞数が多い場合(2.5 × 10⁵個)とほぼ同程度の割合となった。

■ まだ使ったことがない方へ一言

ThruPLEX® DNA-Seq Kitは、少量から比較的多めのDNAでも使用できることから、少数細胞のChIP-Seq解析を行いたい方はもちろん、サンプル量が少量かどうか見積もることが非常に困難な方にもおすすめです。簡便で効率よくChIP DNAをライブラリー化できるため、初めての方にもおすすめです。

■ 関連製品: Index Kit (Indexプライマー) ※他にも種類があります。詳しくはウェブサイトでご確認ください。

シングルインデックス (イルミナ社 TruSeq DNA シングルインデックス配列)

製品名	Index 種類	容量	製品コード	価格
DNA Single Index Kit - 12S Set A	12	96回	R400695	¥54,000

デュアルインデックス (イルミナ社 Nextera XT Index Kit v2 インデックス配列)

製品名	Index 種類	容量	製品コード	価格
DNA HT Dual Index Kit - 24N	24	48回	R400664	¥43,000

ユニークデュアルインデックス ("IDT for Illumina UD" ユニークデュアルインデックス配列)

製品名	Index 種類	容量	製品コード	価格
DNA Unique Dual Index Kit - 24U Set A	24	48回	R400665	¥49,200

NGSミニ情報 ② ▶▶▶

total RNA 100 ng~1 µgからイルミナ社NGS用ライブラリーを迅速に調製!

SMARTer® Stranded Total RNA Sample Prep Kit - HI Mammalian

(製品コード 634873 容量 12回 価格 ¥192,000)

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.3のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、微量な検体からでも確実に正確な菌叢解析が可能になりました。

【キーワード】 菌叢解析、メタゲノム、ショットガンシーケンス、微量検体、イルミナ社NGS装置

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した微量検体からの確実な菌叢解析 (ショットガンメタゲノムシーケンス)

(データ: タカラバイオ取得)

■ 実験の背景

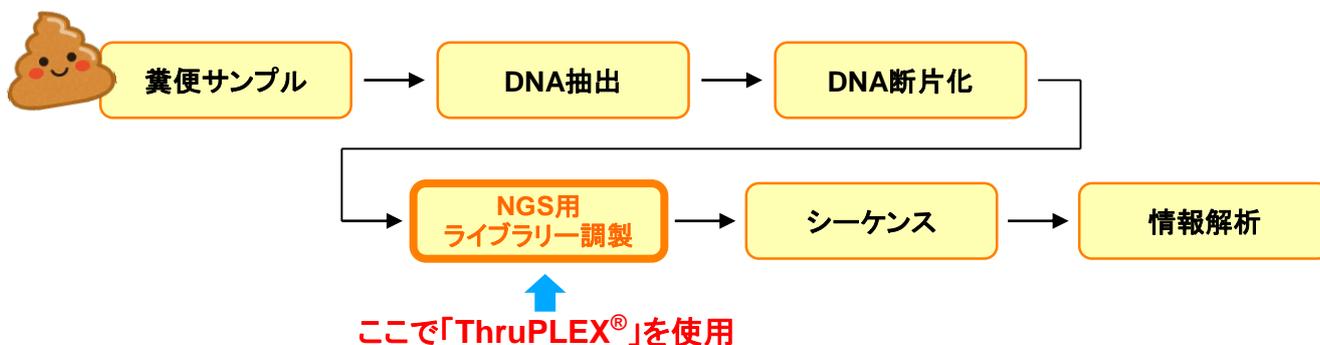
ヒトの健康や疾患に細菌叢が大きく関わっていることが明らかになってきており、近年、シーケンスコストの低下や解析技術の向上により、高精度で網羅的な解析が期待できるショットガンシーケンス手法が注目されている。細菌叢解析においては、核酸の調製方法や採取する部位によって回収される核酸量は大きく変動し、場合によっては非常に微量な検体を材料とする場合もあるため、微量サンプルからの解析プロトコルの開発が望まれる。今回、さまざまな量の糞便検体および20菌種混合標準検体(ATCC)を材料とし、ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用してライブラリーを調製して解析を行った。20菌種混合標準検体では、C社ライブラリー調製キットとの比較も行った。

■ 使用製品: わずか50 pgのDNAからでも高品質ライブラリーが調製可能なキット

製品名	容量	製品コード	価格
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000

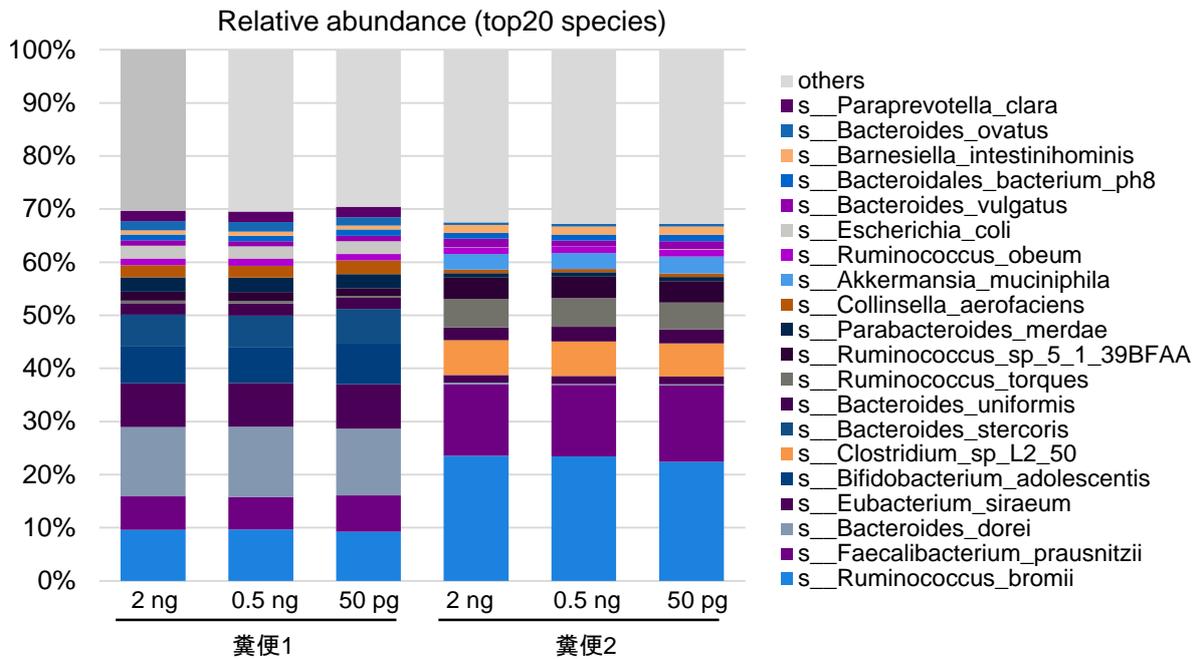
※別途Index Kitが必要です。

■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



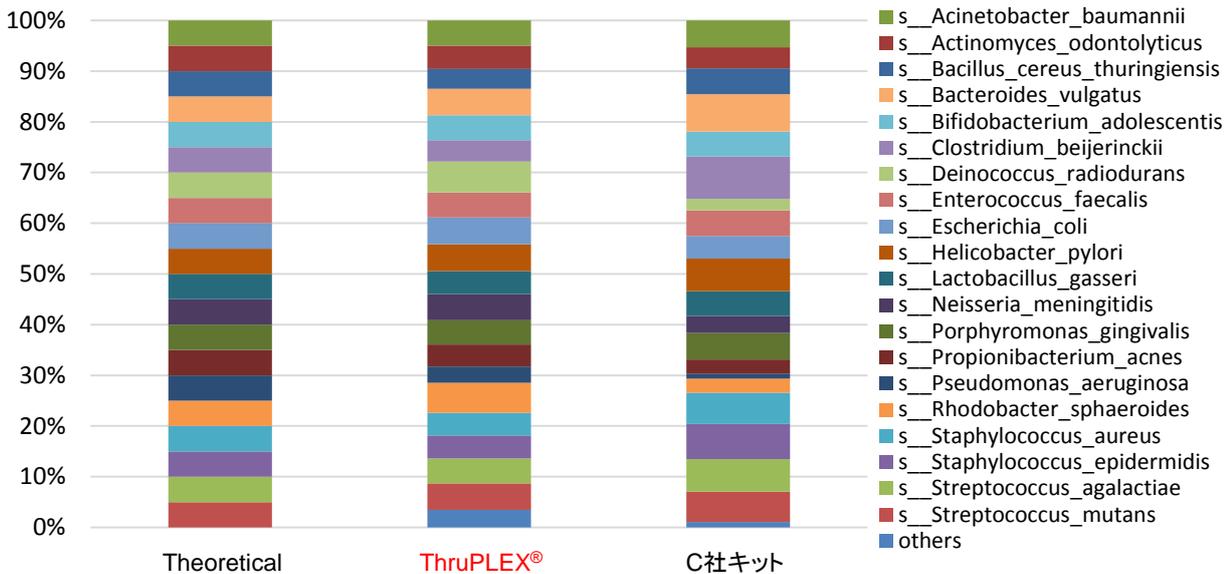
NGS試薬担当が、詳しい製品説明にお伺いいたします。ご希望の方は弊社営業担当、もしくは弊社試薬販売店までお気軽にお声かけください。

■ さまざまな糞便量における菌種存在比の比較



糞便1、2で検出された菌種のうち、存在比の高い上位20種について、各インプットDNA量における菌種の存在比を比較した。各糞便において、インプットDNA量に関わらず菌種の存在比は同程度であり、微量検体からでも確実な菌叢解析が可能なが示された。

■ 他社ライブラリー調製キットとの細菌叢解析結果の比較 —Mock DNA(20菌種由来ゲノム等量混合物)の解析—



20菌種由来ゲノムDNAが等量混合されたMock DNAサンプルから、ThruPLEX®およびC社ライブラリー調製キットを用いてショットガンメタゲノム解析を行った。検出された菌種の組成比を比較したところ、ThruPLEX®の方がC社キットよりも理論値に近く、より正確な菌叢解析が行えることが示された。

NGSミニ情報 ③

シングルセルからの信頼性の高いSNV・CNV解析を実現する全ゲノム増幅キット

PicoPLEX® Single Cell WGA Kit v3

(製品コード R300718 容量 24回 価格 ¥80,000)

調製したサンプルはNGS、アレイ、qPCR解析などに使用できます！

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.4のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、低頻度の変異遺伝子を正確に検出することが可能になりました。

【キーワード】 cell free DNA、低頻度変異解析、分子バーコード(UMI)、イルミナ社NGS装置

分子バーコード付きライブラリー調製キット ThruPLEX® Tag-seq Kitの使用で、cell free DNAで低頻度変異解析を実現

(データ: タカラバイオ取得)

■ 実験の背景

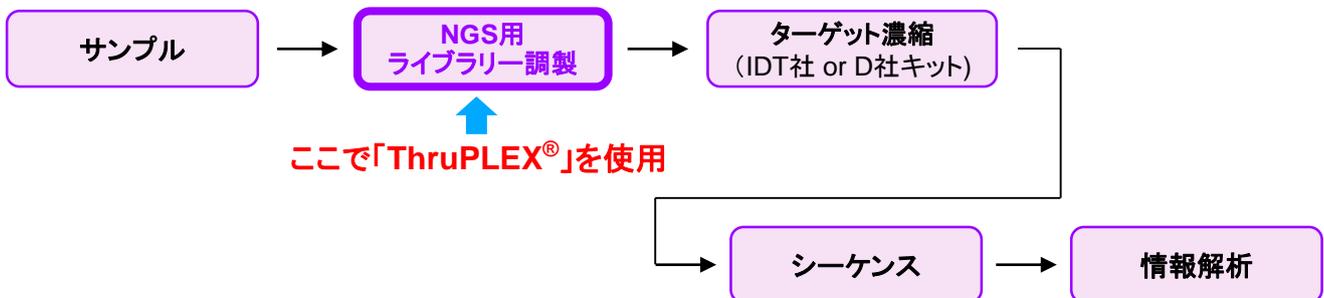
がん研究において、cell free DNA中の低頻度の変異を正確に検出することは非常に重要である。特に、次世代シーケンサーを用いた解析では、ライブラリー調製中の増幅エラーやシーケンスエラーがあり、サンプル自身の低頻度変異と区別することが困難な場合がある。ThruPLEX® Tag-seq Kitは、分子バーコード(UMI)を搭載したライブラリー調製キットである。UMIを用いることで、偽陽性の変異コールを減らすことが可能となり、低頻度で存在する変異を正確に検出することができる。今回は、ライブラリー調製にThruPLEX® Tag-seq Kitを使用し、ターゲット濃縮にxGen Lockdown Probes (IDT社)とD社濃縮キットを用いて評価した。

■ 使用製品: 1分子レベルで解析可能な分子バーコード付ライブラリー調製キット

製品名	Index		容量	製品コード	価格
	種類	タイプ			
ThruPLEX® Tag-seq 6S (12) Kit	6	シングル	12回	R400584	¥123,000

※ 本キットにはIndexが含まれていますので、Index Kitを別途購入いただく必要はありません。

■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



NGS試薬担当が、詳しい製品説明にお伺いいたします。ご希望の方は弊社営業担当、もしくは弊社試薬販売店までお気軽にお声かけください。

変異遺伝子検出結果

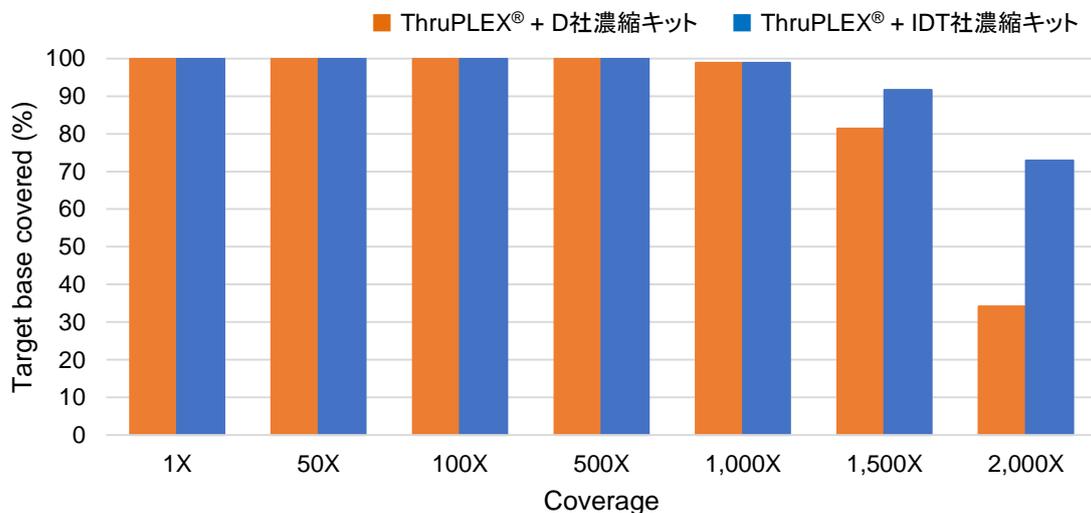
ターゲット濃縮キット	ThruPLEX® + IDT社濃縮キット						ThruPLEX® + D社濃縮キット					
サンプル情報	1.0% Multiplex I cfDNA			0.1% Multiplex I cfDNA			1.0% Multiplex I cfDNA			0.1% Multiplex I cfDNA		
マッピングソフト	BWA-MEM											
変異検出ソフト	独自パイプライン						独自パイプライン					
Variant	REF	ALT	AF									
EGFR (L858R)	2,192	20	0.91%	1,977	2	0.10%	1,499	18	1.20%	1,679	3	0.18%
EGFR (ΔE746-A750)	1,966	9	0.46%	1,869	0	0.00%	1,471	5	0.34%	1,536	3	0.20%
EGFR (T790M)	2,163	30	1.39%	2,160	3	0.14%	1,573	14	0.89%	1,524	0	0.00%
EGFR (V769-D770Ins)	1,997	9	0.45%	2092	0	0.00%	739	3	0.41%	739	0	0.00%
KRAS (G12D)	1,320	19	1.44%	1,179	2	0.17%	1,135	7	0.62%	1,099	1	0.09%
NRAS (Q61K)	4,093	40	0.98%	3,505	2	0.06%	1,826	15	0.82%	1,861	0	0.00%
NRAS (A59T)	4,158	42	1.01%	3,594	8	0.22%	1,835	30	1.63%	1,847	5	0.27%
PIK3CA (E545K)	1,309	15	1.15%	1112	1	0.09%	1,172	5	0.43%	987	2	0.20%
変異検出数(検出感度)	8 (100%)			6 (75%)			8 (100%)			5 (62.5%)		

REF: 参照配列と同じ塩基を持つリード数
 ALT: 変異配列と同じ塩基を持つリード数
 AF: 変異頻度(全リード中のALTのリード比率として算出)

1% Multiplex cfDNAでは、IDT社、D社いずれも8種の既知の変異遺伝子を検出できた。一方、0.1% cfDNAでは、IDT社で6種、D社で5種を検出できた。分子バーコードを搭載したThruPLEX® Tag-seq KitとIDT社の濃縮キットを用いることで、より低頻度の変異遺伝子を正確に検出できることが示された。

各カバレッジにおけるターゲット領域の塩基カバー率の比較

※D社、IDT社で共通するターゲット遺伝子(30 kb)のデータのみを比較に使用



ThruPLEX® + D社濃縮キットより、ThruPLEX® + IDT社濃縮キットの方が高カバレッジにおけるカバー率が高かった。よって、ThruPLEX® + IDT社濃縮キットの組み合わせの方が低頻度の変異検出に適していることが示された。

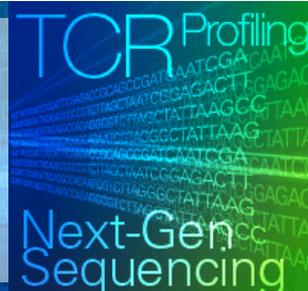
NGSミニ情報 ④ ▶▶▶

ヒトおよびマウスのTCRα/β V(D)J可変領域の完全長シーケンスが可能

SMARTer® Human TCR a/b Profiling Kit (製品コード 635014)

SMARTer® Mouse TCR a/b Profiling Kit (製品コード 634402)

容量 12回 価格 ¥180,000



次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.5のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、微量DNAからでも効率よく発生制御因子のChIP-Seq解析が行える手法を確立しました。

【キーワード】 微量DNA、ChIP-Seq、クロマチン免疫沈降、発生制御因子、動物胚

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した、ネッタイツメガエル初期胚で発現する発生制御因子に対するChIP-Seq解析手法の確立

(データご提供: 理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析技術研究チーム 安岡有理様)

■ 実験の背景

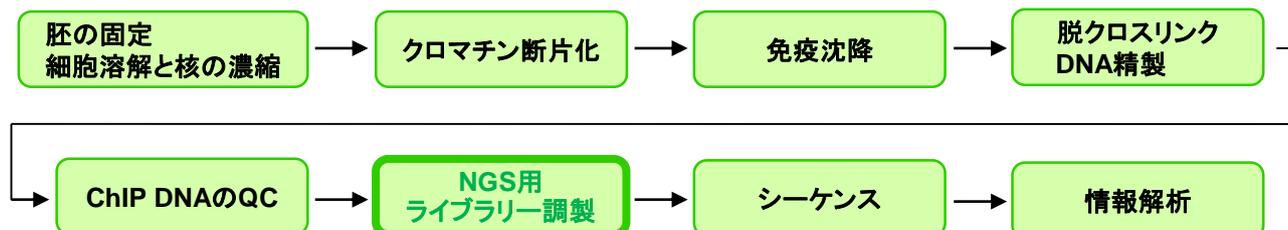
ChIP-Seqとは、クロマチン免疫沈降(ChIP)によって目的タンパク質が結合しているゲノムDNA領域を濃縮し、その領域を次世代シーケンサー(NGS)で解読することで網羅的に決定する手法である。動物の胚発生において、細胞の運命決定を担う転写因子と呼ばれる一連のDNA結合タンパク質がどのようにゲノムDNAに作用して細胞の発生運命を制御しているのかを解き明かす上で、動物胚を用いたChIP-Seq解析は非常に重要な意味を持つ。しかし、動物胚の中でも一部の細胞にのみ発現する発生制御因子(転写因子)を標的としたChIP-Seq解析を実施するためには、限られた発現細胞からChIPによって濃縮されたごく微量のDNAを用いてNGS解析を行う必要がある。我々が研究に用いているネッタイツメガエルは、同調的に発生する胚を一度に多量に入手できる優れた実験動物であり、特に初期発生における遺伝子発現制御ネットワークの解析に適している。そこで我々は、少量のネッタイツメガエル胚からChIPによって濃縮された微量DNAを、タカラバイオ社のThruPLEX® DNA-Seq KitによってNGSライブラリー化することで、効率よく発生制御因子のChIP-Seq解析を行う手法を確立した。

■ 使用製品: わずか50 pgのDNAからでも高品質ライブラリーが調製可能なキット

製品名	容量	製品コード	価格
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000

※別途Index Kitが必要です。

■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



ここで「ThruPLEX®」を使用

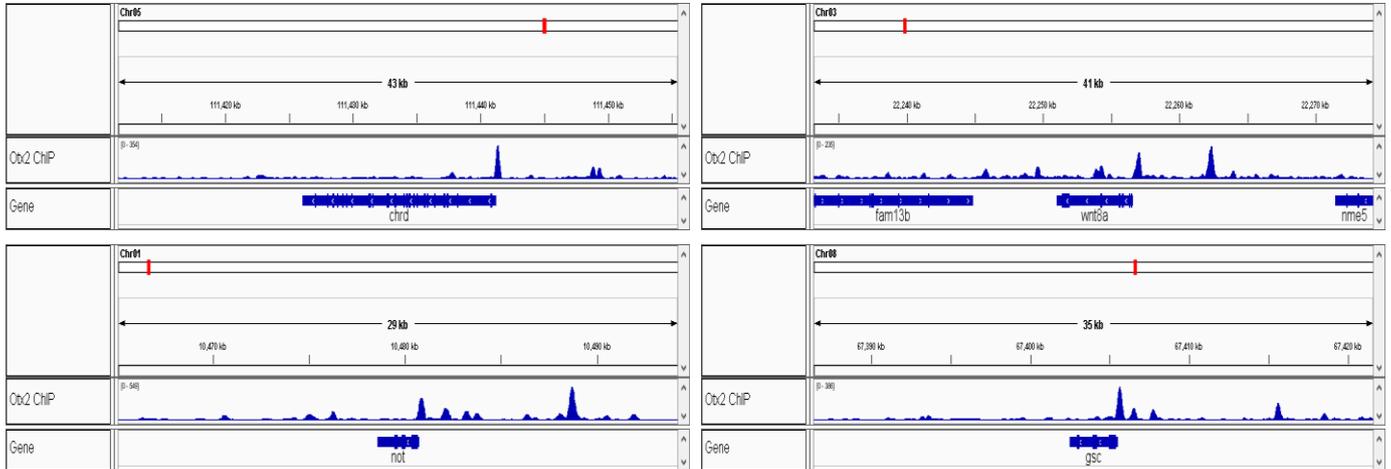


■ マッピング結果

シーケンス: NextSeq 550
(75 bp × 2)
マッピング: BWA

サンプル	Total reads	Mapped reads (%)
Input	74,426,066	70,219,181 (94.35%)
Otx2 ChIP	82,794,598	75,710,767 (91.44%)

■ IGVによるOtx2 ChIP-Seq結果の可視化例



ネットイツメガエル原腸胚 約250個からChIP反応を行い、1 ng程度のChIP DNAを用いてシーケンスライブラリーを作製した(PCRサイクル=12)。
マッピングデータを見る限り、以前に約2,000個の原腸胚を用いて行ったChIP-Seq解析(※)と同等の結果が得られた。
※ Yasuoka et al., *Nature Communications* 2014; 5:4322.

■ 今回の実験結果を受けての今後のご計画・展望

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを用いることで微量DNAからのライブラリー作製が可能となったので、同一転写因子に対するChIP-Seq解析を繰り返し行い、転写因子がどの程度のばらつき(揺らぎ)を持って結合しているのかを今後明らかにしたい。

<新学術領域「進化制約方向性」公募研究班 http://constrained-evo.org/proposed_projects.html>

標的とする転写因子や使用する抗体にもよるが、ChIPに用いる胚の数を50~100個ほどに減らせる可能性もあり、今後さらなる条件検討によってより効率よく研究を進められると期待できる。

■ ThruPLEXを使ってChIP-Seqをしたことがない方へ

ThruPLEX® DNA-Seq Kitは蛍光光度計でも測定できないほどの微量DNAからライブラリー作製が可能なので、少数細胞のChIP-Seq解析を行う方にはオススメです。

実験の工程が少なく簡便で、キット内の試薬のチューブラベルも色分けされていてわかりやすく、とても使いやすい仕様になっているので、ライブラリー作製に慣れていない方にもオススメです。

NGSミニ情報 ⑤

ヒトおよびマウスのBCR H鎖/L鎖の可変領域の完全長シーケンス

SMARTer® Human BCR IgG IgM H/K/L Profiling Kit (製品コード 634466)

SMARTer® Mouse BCR IgG H/K/L Profiling Kit (製品コード 634422)

容量 12回 価格 ¥180,000

BCR Profiling
Next-Gen Sequencing

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.6のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、ゲノムDNA上のタンパク質結合部位をより網羅的に解析できるようになりました。

【キーワード】 DMS-Seq解析、インビボフットプリント法、タンパク質-DNA相互作用

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した出芽酵母のDMS-Seq解析

(データご提供: 理化学研究所 生命医科学研究センター マイクロバイオーム研究チーム 梅山大地様)

■ 実験の背景

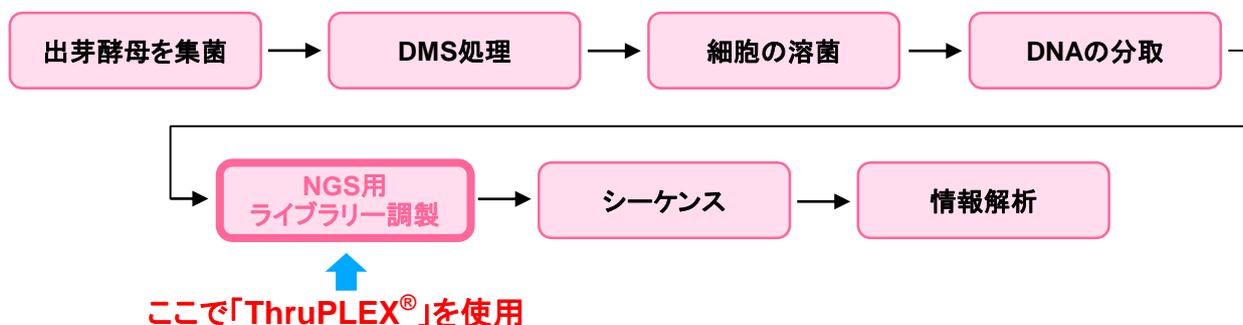
ゲノムの働き方を包括的に理解するためには、ゲノムDNAのどこに転写因子やヒストンなどのタンパク質が結合しているかを網羅的に明らかにする必要があります。これまで用いられてきたゲノムフットプリンティングというアプローチでは、細胞から単離した核に対してDNA分解酵素を働かせる方法などが用いられてきた。しかし、それらの方法は操作が難しく、核を単離する過程でタンパク質とDNAの相互作用が変化あるいは消失する危険性があった。そこで、我々は細胞膜透過性のDNAメチル化試薬であるジメチル硫酸(DMS)に着目し、新規のインビボフットプリント法であるDMS-Seq法の開発に取り組んでいる。プロトコールのさらなる高度化を目指して、タカラバイオ社のThruPLEX® DNA-Seq Kitを用いたライブラリー化を行った。

■ 使用製品: わずか50 pgのDNAからでも高品質ライブラリーが調製可能なキット

製品名	容量	製品コード	価格
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000

※別途Index Kitが必要です。

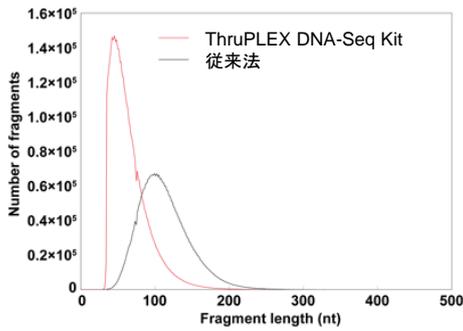
■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



下記の文献もご覧ください。

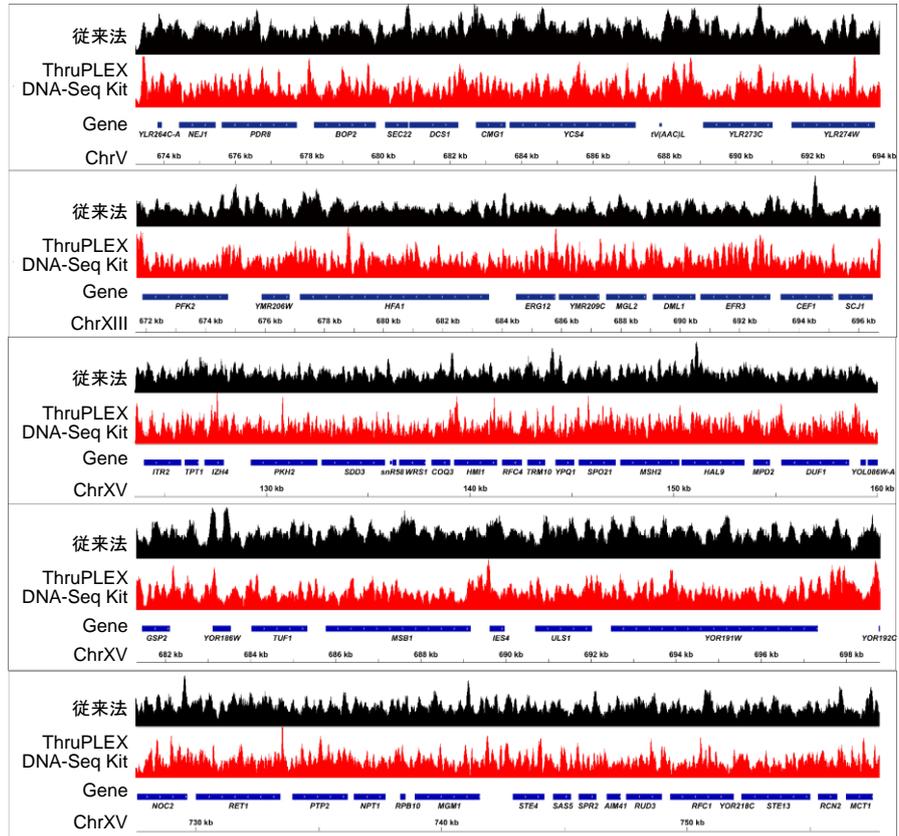
Umeyama, T. *et al.* DMS-Seq for *In Vivo* Genome-wide Mapping of Protein-DNA Interactions and Nucleosome Centers. *Cell Rep.* **22**, 289-300 (2017)

■ 検出された断片長の従来法との比較



ThruPLEX® DNA-Seq Kitを用いることで従来よりも短い断片を含むライブラリー調製ができた。

■ IGVによるピーク検出の比較



マッピングの結果、ThruPLEX® DNA-Seq Kitを用いることで、従来観察されなかったシャープなピークが周期的に表れる領域を見出すことができた。

■ 今回の実験結果を受けてのコメント

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを用いることで、従来見過ごしていた小さなフラグメントのシーケンスを得ることができるようになり、これまでよりも網羅性の高い解析を行うことが可能となった。

■ ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使ったことがない方へのコメント

簡便な操作でライブラリーを作製することができ、チューブも色分けされていてわかりやすい構成になっているため、ライブラリー作製に慣れていない方にもお勧めします。

NGSミニ情報 ⑥

最短納期 3週間!

次世代シーケンス解析 (ショートリード) サービス – ライブラリー受入 –

受託サービス

✓ オンライン注文に対応 ✓ 短納期対応 ✓ Fastqファイル納品

サービス内容	送付サンプル	データ量 (想定量)	価格	納期
ライブラリー受け入れ 相乗りシーケンス解析	混合済みライブラリー (1~16インデックス可能) 濃度: 10 nM以上 (20 µl以上)	6.6億リード または 100 Gbase	¥280,000	最短 3週間

★ 詳細は...

タカラバイオ 相乗りシーケンス

検索

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.7のポイント: セルソーターを用いてシングルセルRNA-Seqを行う場合、細胞分取までの作業が重要になります。実験の成功に役立つ注意点をまとめました。

【キーワード】 細胞、セルソーター、シングルセル解析、SMART-Seq

セルソーターを用いたシングルセルRNA-Seq実験を成功させるための5つのTips

高品質のシングルセルRNA-Seqデータを得るためには、シングルかつ生きた細胞を捕獲した後に、ライブラリー調製前にRNAが分解することを防ぐため迅速かつ慎重に作業をすることが重要です。細胞のソーティングを成功させるためには、ソーティング技術の慎重な計画と最適化が必要です。

ここでは、ライブラリー調製キット使用の上流において、一般的な問題を回避し、サンプル品質を最高にするための細胞収集についての推奨事項を含む5つのヒントをご紹介します。

1. セルソーターを詰まらせない

目詰まりしたフローサイトメーターほど悪いものではありません！ソーティングが遅くなると、サンプルが劣化する可能性があります。したがって、遠心分離、セルストレーナまたはその他の方法で細胞破片や細胞塊を除去し、それらが残存していないことを確認する必要があります。細胞生存率を維持したままシングルセル数を最大にするために、単離技術を最適化してください。マグネシウムとカルシウムは多くの接着分子に必要なため、ろ過した1×PBS (EDTA、MgおよびCa不含、1~2%BSA添加)またはBD FACS Pre-Sort Buffer (BD社、Cat No. 563503)に細胞を懸濁することをお勧めします。また、BD FACS Pre-Sort Bufferは生存率を維持するために血清タンパク質を含んでいることに注意する必要があります。培地にソーティングされた細胞は生存率が下がることもあり (Kissner 2015)、cDNA合成を阻害することもあります。生きたシングルセルを最大限に取得するために、ソーティング前に生存確認用の染色を行うことを推奨します。

2. 細胞をやさしく扱う

セルソーティングは細胞に対して優しくありませんが、ソーティング中の細胞へのダメージや溶解を最小限に抑えるために、できることがいくつかあります。Tips 1でご紹介したソーティング前のバッファーガイドライン(1×PBSまたはBD FACS Pre-Sort Buffer)に従うことに加えて、特に脆弱な細胞に対しては、ノズルのサイズを大きくしたり、流速を遅くすることをお勧めします。セルソーターを最適な設定にするため、フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーと協力して行ってください。特に低流速で希少細胞のソーティングを行う場合、時間がかかることがあります。ソーティング前に濃縮するか、2段階のソーティングを行うことをお勧めします。

3. ウェルの底にソーティング

これは簡単に思えますが、重要な問題です。プレート/チューブのウェルの底に、細胞を含む液滴が落ちるようにセルソーターがセッティングされていることを確認してください。プレートやチューブが適切な位置にない場合、細胞がウェルの側面に集まって乾燥することで、RNAが分解する可能性があります。最悪の場合、細胞はウェル内に全く回収されないかもしれません。フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーと協力して、ソーターを調整してください。液滴を適切に落とすために、蛍光ビーズ (Zigon *et al.* 2018)、HRPを用いたレポーター (Rodrigues and Monard 2016)、さらにはリトマス試験紙 (Baumgartner *et al.* 2014)を用いた品質管理方法を開発した研究者もいるので、それらの文献を参考にすることもできます。



4. 溶解バッファーにソーティング

細胞のソーティング後、RNAはできるだけ早く安定化させる必要があります。したがって、RNase阻害剤を含む新鮮な冷却された溶解バッファーにソーティングすることをお勧めします。細胞がプレートあるいはチューブに入ったら、100×gで15～30秒間穏やかに遠心します。すぐにcDNA合成に進まない場合は、サンプルをドライアイス上に置いて急速凍結し、-80°Cで数週間保存できます。これらのステップによって、RNase阻害剤を含む溶解バッファー中に確実に細胞をソーティングすることができます（液滴は跳ね返ることがあるため）。
弊社シングルセルRNA-Seqキットにおける推奨事項は、下記の表をご覧ください。

各SMART-Seqキットの推奨溶解バッファー

キット名	推奨溶解バッファー	容量/well	内容
SMART-Seq Single Cell	CDS Sorting Solution	12.5 µl	Lysis buffer, RNase inhibitor and CDS primer
SMART-Seq HT	CDS Sorting Solution	12.5 µl	Lysis buffer, RNase inhibitor and CDS primer
SMART-Seq Stranded	1.25×Lysis Buffer Mix	8 µl	Lysis buffer and RNase inhibitor

※バッファー組成の詳細は、各キットのユーザーマニュアルに記載しています。

5. 専門家への相談

セルソーティングは複雑で、セルソーターの機種により特性が異なります。実験を始める前に、フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーにご相談ください。正しく実験を行うための手助けをしてくれます。

◆ 参考文献

Baumgartner, T. *et al.* "Direct visual confirmation of sort material deposition alignment at the bottom of 96 and 384 well PCR plate wells." Poster presented at the XXIX Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, Ft. Lauderdale, FL, May 2014.

Kissner. How Cell Culture Medium Can Decrease Cell Viability During A Flow Cytometry Cell Sorting Experiment. *Expert Cytom.* (2015).

Rodrigues, O. R. & Monard, S. A rapid method to verify single-cell deposition setup for cell sorters. *Cytom. Part A* **89**, 594-600 (2016).

Zigon, E. S. *et al.* A rapid single cell sorting verification method using plate-based image cytometry. *Cytom. Part A* **93**, 1060-1065 (2018).

◆ シングルセルRNA-Seqで使用可能なcDNA調製キットまたはライブラリー調製キット

製品名	容量	製品コード	価格
SMART-Seq® Single Cell Kit ※	48回	634471	¥546,000
SMART-Seq® HT Kit ※	48回	634456	¥280,000
SMART-Seq® Stranded Kit	48回	634443	¥658,000

※断片化とライブラリー調製のために、イルミナ社Nextera XT DNA Library Prep Kit、Nextera XT Index Kitが別途必要です。

NGSミニ情報 ⑦

受託サービス

PacBio® Sequel II Systemは、GCバイアスの無い数十キロベース単位の超ロングリードシーケンスにより、ショートリードシーケンスでは困難な大きな構造変化を捉えることが可能です。

- 数十kbのロングリードシーケンスで、高精度なゲノム配列構築が可能
- 一度に100 Gb以上のデータ取得可能
- 1セルで複数サンプルの同時解析（相乗りシーケンス）が可能



2019年9月発行: タカラバイオ株式会社NGS試薬チーム

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.8のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使うことで、解析が難しいFFPE DNAサンプルからでもシーケンス解析が可能となりました。

【キーワード】 FFPE DNA、ホルマリン固定、パラフィン包埋、ターゲットシーケンス

ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用した、FFPE DNAサンプルのNGS解析

(クロンテック取得データ)

■ 実験の背景

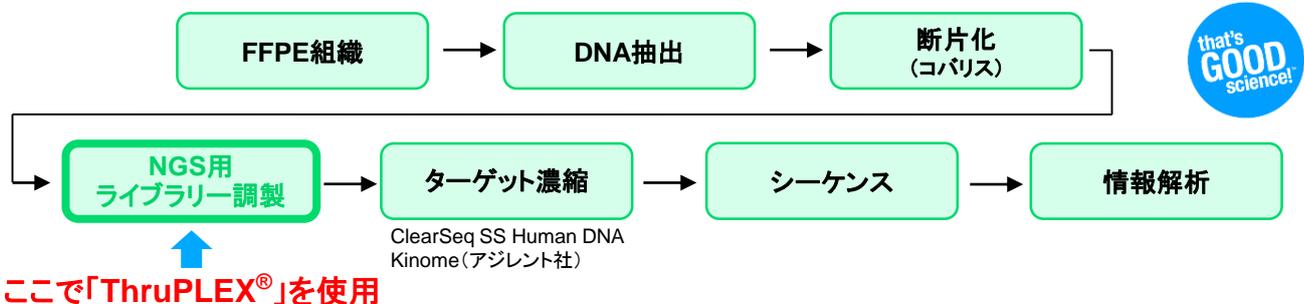
ホルマリン固定・パラフィン包埋(FFPE)サンプルは一般的に、組織学的研究のためにヒト生検から収集・保存される。ホルマリン固定法は、細胞内の核酸およびタンパク質を架橋してサンプルをパラフィンワックスで包むため、室温で長期保存が可能であり、世界中のバイオバンクや研究者は何百ものFFPEサンプルを保存している。ライブラリー調製および次世代シーケンス技術が発展することにより、保存されたFFPEサンプルからDNAを回収して重要なゲノム情報を得ることができるようになった。したがってFFPEサンプルは貴重な研究材料であるが、保存中にDNAに化学変化が生じる場合があること、保存工程の標準化が無いこと、およびサンプルによって保存年数が異なるなど、複数の要因があるためDNAの品質がさまざまである。本実験では、各種FFPE由来のDNAからThruPLEX® DNA-Seq Kitまたは他社キットを用いてライブラリー調製を行い、性能評価を行った。

■ 使用製品： GCバイアスの少ない簡単操作のライブラリー調製キット

製品名	容量	製品コード	価格
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000

※別途Index Kitが必要です。

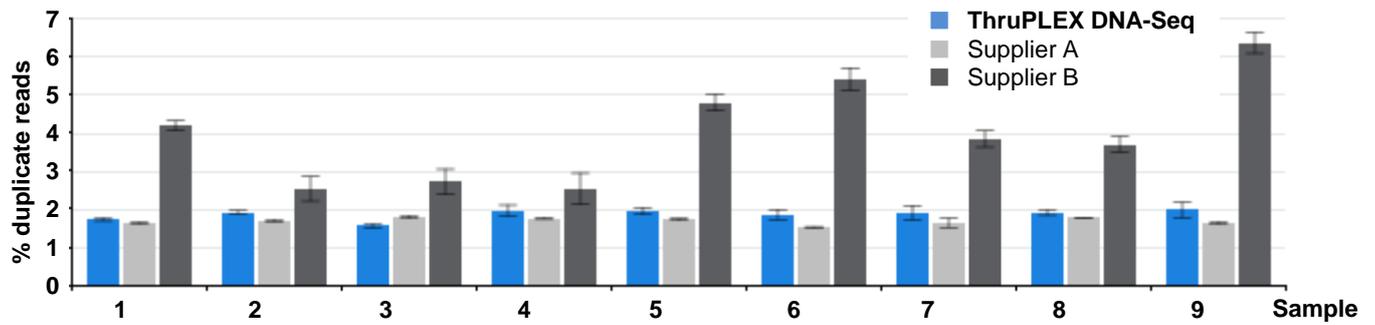
■ 実験ワークフローとサンプル情報 ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



【サンプル情報】

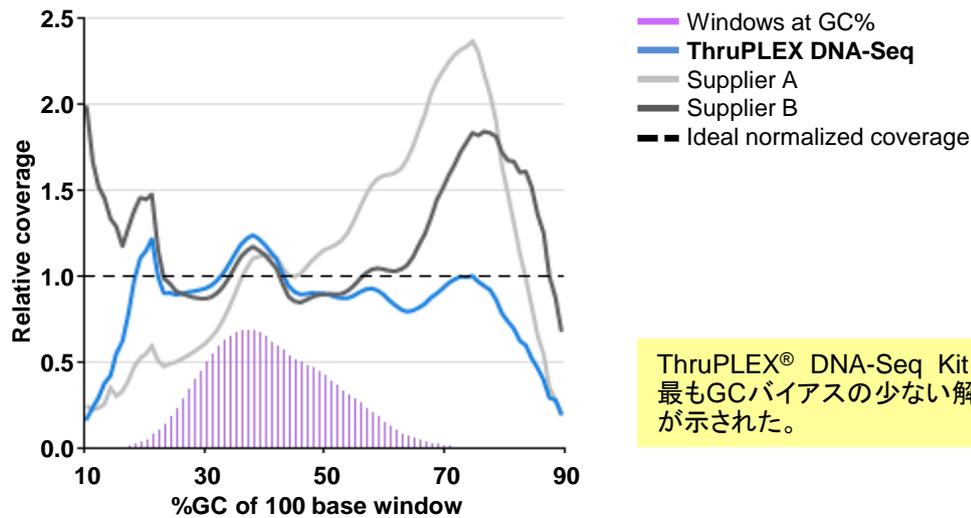
Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Type	NAT	Malignant	Malignant	NAT	Malignant	Malignant	NAT	Malignant	NAT
Source tissue	Cervix/uterus	Colon/rectum	Colon/rectum	Colon/rectum	Ovary	Kidney	Kidney	Kidney	Kidney

■ 各社キットにおけるduplicate率



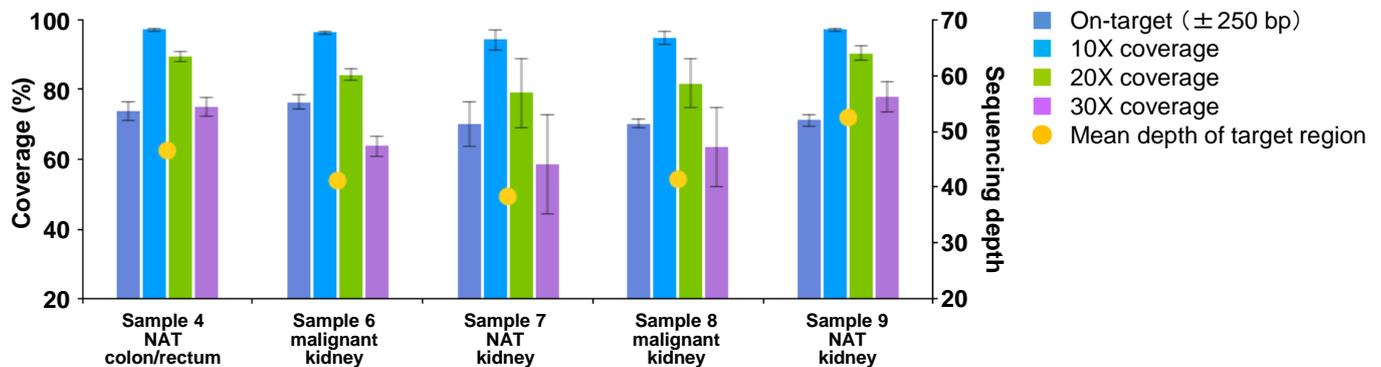
FFPE DNAサンプル 100 ngからライブラリーを作製してシーケンス解析を行った。Supplier Bはduplicate率が3~6%と高いが、ThruPLEX® DNA-Seq KitはSupplier Aと同等で2%以下となり、duplicate率が低いことが示された。

■ GCカバレッジの比較



ThruPLEX® DNA-Seq Kitは、他社と比較して最もGCバイアスの少ない解析が可能であることが示された。

■ ターゲットシーケンス解析結果

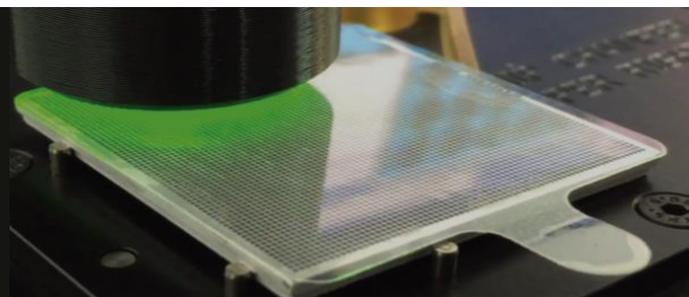


ThruPLEX® DNA-Seq Kitでライブラリー作製後、アジレント社のClearSeq SS Human DNA Kinome (~3.2 Mb)を用いてターゲット遺伝子を濃縮し、シーケンス解析を行った。オンターゲット率(青色)はすべてのサンプルにおいて70%以上、平均カバレッジ(黄色)は40-50Xとなり、FFPEサンプルでもターゲットシーケンスが可能であることが示された。

NGSニ情報 ⑧

シングルセル自動調製システム ICELL8® cx Single-Cell System

- ★ 幅広い細胞サイズ(5~100 μm)に対応
- ★ 細胞の生死判別と1細胞かどうかを自動で判定



次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

vol.9のポイント: タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「SMART-Seq® Stranded Kit」を使うことで、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)のシングルセル解析が可能になりました。

【キーワード】 シングルセルRNA-Seq、セルソーター、TIL、EpCAM、CD45、腫瘍細胞、ストランド情報

SMART-Seq® Stranded Kitを使用した腫瘍細胞のシングルセルRNA-Seq解析

(クオンテック取得データ)

■ 実験の背景

腫瘍に関連する細胞の機能や量を解析するために、最近ではシングルセルRNAシーケンス(scRNA-Seq)が使用されることが多く、細胞の不均一性を詳しく見ることが可能となった。ただし、シングルセルなどの微量のRNAから生物学的情報を得るためには、超高感度で再現性の高いライブラリー調製方法が必要である。

タカラバイオのSMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing(製品コード 634888ほか)は、mRNAの3'側だけではなく、全長の情報を取得できるため、非常に感度の高いscRNA-Seqライブラリーを調製することができる。ただし、この方法ではPolyA mRNAしか解析することができない。そこで、non-PolyA RNAも解析できるようにSMART-Seqテクノロジーを改良し、オリゴdTプライミングではなく、ランダムプライミングを行うシングルセルRNA-Seqライブラリー調製キット SMART-Seq® Stranded Kitを開発した。SMART-Seq® Stranded Kitは、RNAのPolyA状態に関わらずあらゆるRNAを解析することが可能で、ストランド情報も保持しているため、オーバーラップする遺伝子を区別することができ、ロングノンコーディングRNA(lncRNA)のアノテーション情報の取得や定量も可能である。

本実験では、腫瘍細胞の不均一性解析を行う際にSMART-Seq® Stranded Kitが有効であることを示すため、ステージIVの卵巣がん(漿液性がん)患者の固形腫瘍から剥離したシングルセルを解析した。細胞分離にはセルソーターを用いて、96ウェルプレートにCD45+白血球とEpCAM+腫瘍細胞を分取し、ライブラリー作製、シーケンス、情報解析を行った。CD45+細胞で4,717個の遺伝子、EpCAM+細胞で8,039個の遺伝子が検出され、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)や卵巣がんに関連したマーカー遺伝子も同定することができた。

■ 使用製品: シングルセル or 10 pgのtotal RNAからストランド情報を保持したライブラリー調製が可能

製品名	容量	製品コード	価格
SMART-Seq® Stranded Kit	12回	634442	¥188,000

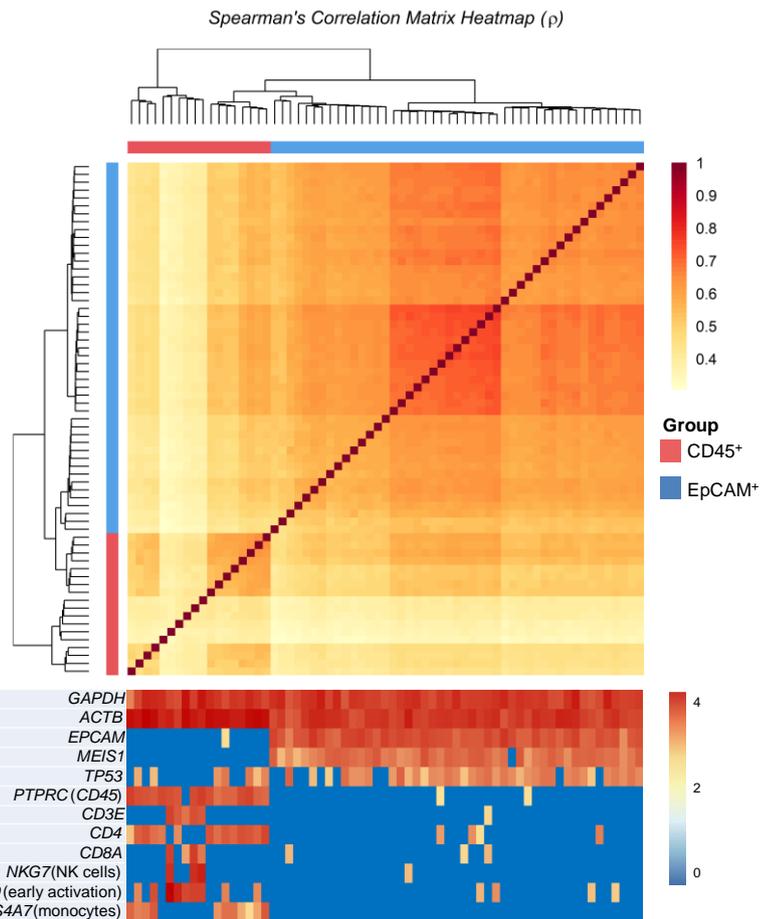
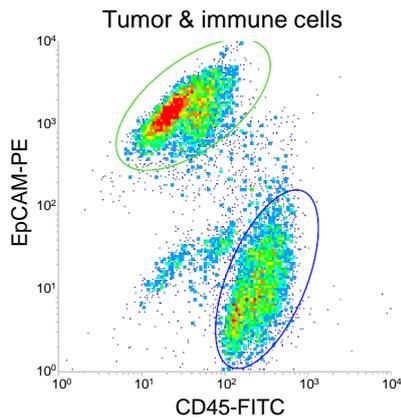
■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



ここで
「SMART-Seq® Stranded」
を使用

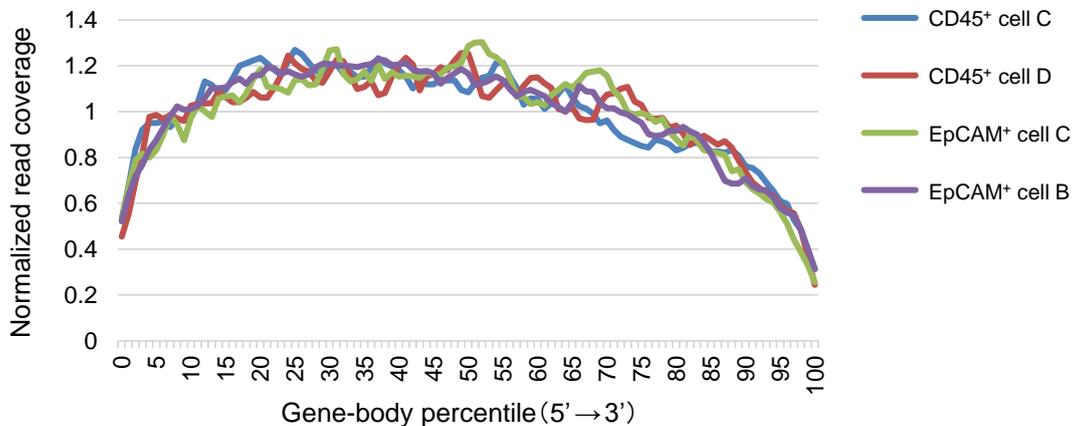


CD45+細胞とEpCAM+細胞の遺伝子発現比較



腫瘍細胞からCD45+細胞とEpCAM+細胞をセルソーターを用いてシングルセル分離を行い(上図)、SMART-Seq® Stranded Kitを用いてライブラリーを作製し、シーケンス解析を行った。スピアマン相関係数を用いてクラスター解析を行い(右上図)、各遺伝子の発現量を確認した(右下図)。ハウスキーピング遺伝子(GAPDH、ACTB)、がん関連遺伝子(EpCAM、TP53)、卵巣がんで重要な遺伝子(MEIS1)、TILで濃縮される遺伝子(CD45以下の7種)が検出され、TILおよび卵巣がんと関係する遺伝子を同定することができた。

Gene-body coverage



CD45+細胞、EpCAM+細胞からそれぞれ2細胞について、gene-body coverageの解析を行った。わずかに5'バイアスが検出されているが、抽出RNAと同様に(データ示さず)、シングルセル解析でも均一なgene-body coverageを示した。

NGSニ二情報 ⑨

シングルセル自動調製システム ICELL8® cx Single-Cell System

CELLSTUDIO™ Softwareにより、お客様独自のアプリケーションにも対応
 - ATAC-Seq、CUT&Tag、100 μmの心筋細胞解析 -



・イルミナ社とは、Illumina, Inc. (本社：米国カリフォルニア州サンディエゴ) の日本法人であるイルミナ株式会社 (本社：東京港区) をいいます。
・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。 ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。 ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
・本パンフレット記載の価格は2020年3月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2020年2月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店