

—テクニカルノート—

ThruPLEX HV PLUS Kits と他社同タイプキットとの比較

※TB USA 社取得データ

はじめに

ThruPLEX HV は、チャレンジングなサンプルからでも再現性の高い次世代シーケンスを可能にする、完璧かつ高速、高精度なライブラリー調製システムである。

ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS Kit は、ThruPLEX DNA-Seq HV に ThruPLEX HV PLUS Enzymatic Fragmentation Module が含まれた製品である。

ThruPLEX DNA-Seq HV のエンドリペアのステップと並行して、ThruPLEX HV PLUS Enzymatic Fragmentation Module に含まれる酵素により、サンプル DNA のサイズ調整可能な断片化を行うことが可能で (図 1)、機械的断片化や別の酵素による断片化を行っていた時間を省略することができる。ThruPLEX Tag-Seq HV PLUS は、ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS と同様の優れたワークフローと利点を持ちながら、分子バーコード (UMI) を搭載した製品である。

また、すべての ThruPLEX HV システムでユニークデュアルインデックス (UDI) を採用しており、最大で 96 種類のライブラリーまでマルチプレックスで解析できる。

ThruPLEX HV システムが持つ 3 ステップ & 1 チューブプロトコールといった優れた特長により、サンプルロスの防止、および追加のビーズ精製が不要なことから、反応時間の大幅な短縮を実現している。

結果

フラグメンテーションステップを含むシンプルな新ワークフロー

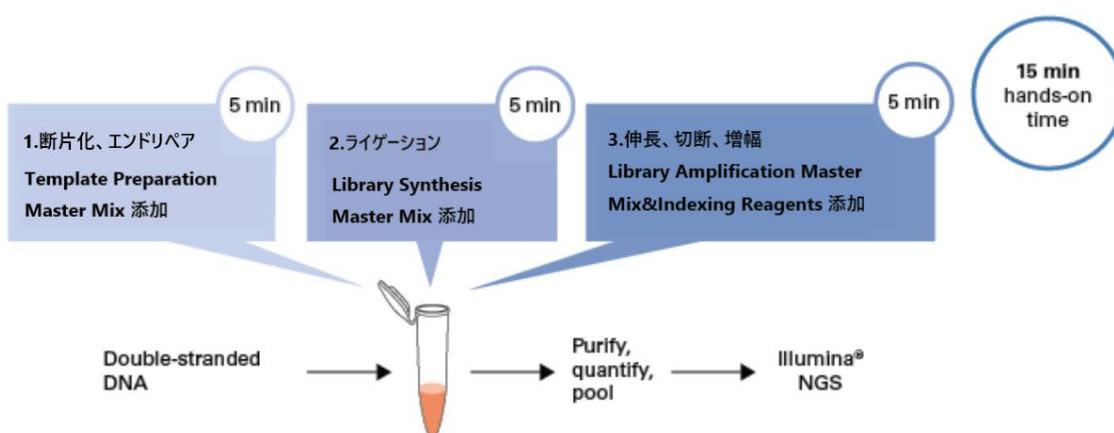


図 1. ThruPLEX DNA-Seq HV のシングルチューブでのライブラリー調製ワークフロー

ThruPLEX DNA-Seq HV ワークフローは、同一ウェル、または同一 PCR チューブで行われる 3 つの簡単なステップで構成されており、操作途中でのサンプル精製や移し替えの必要がない。ThruPLEX HV PLUS システムでは、プロトコールの最初に酵素による断片化が加えられ、二本鎖 DNA (最大インプット液量 30 μ l、最大 DNA 量 200 ng) から高品質なライブラリー調製を効率的に行うことが可能である。

	ThruPLEX HV PLUS	A社キット	B社キット
Hands-on time	15 min	20 min	20 min
Total time	2.4–2.6 hr	2.5–2.7 hr	3.1–3.2 hr
Single-tube workflow	Yes	No	No
Adapter dilution	No	Yes	Yes
Intermediate cleanup	No	Yes	Yes
Post-ligation size selection	No	No	Yes (>100 ng)

表 1. 他社 NGS ライブラリー調製キットとの比較

Total time は、5 ng および 200 ng のサンプルから、ターゲット濃縮に必要なイルミナ社 NGS 装置用デュアルインデックスライブラリーの調製に必要な時間を示している。ThruPLEX DNA-Seq HV は、アダプターの希釈、途中のクリーンアップ、ライゲーション後のサイズセレクションを必要としない唯一のシングルチューブワークフロー製品である。ハンズオンタイムの非常に短いプロトコルが、ThruPLEX DNA-Seq HV の最大の特長である。

ThruPLEX HV PLUS のライブラリー調製システムは、優れた ThruPLEX HV キットのシングルチューブワークフローに酵素フラグメントモジュールによる断片化ステップが組み込まれており、機能がより拡充した (図 1、表 1)。ThruPLEX HV PLUS キットは、この酵素フラグメントモジュールを用いて、300 bp および 450 bp の DNA 断片を調製することが可能である (図 2)。フラグメントサイズは、反応中の酵素濃度を変化させるだけで調整でき、反応時間の伸長や機械的な断片化は必要ない。さらに、ThruPLEX HV PLUS システムは、アダプターの希釈やプロトコルの最適化を必要としないため、ハンズオンタイムを短縮することができる (表 1)。断片化サイズやサンプルインプット量にかかわらず、ワークフローにかかる時間は一定である。

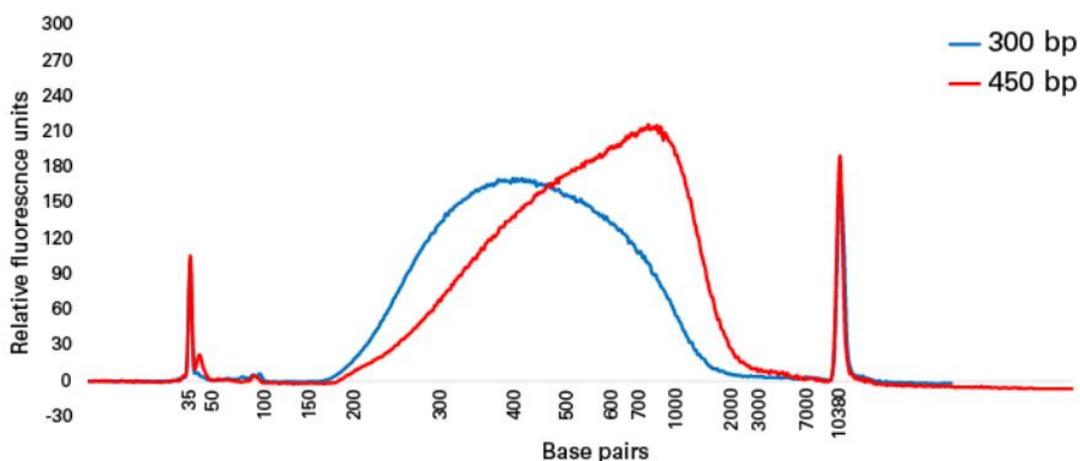


図 2. ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS で調製したライブラリーのバイオアナライザーによる解析

ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS で、5 ng の Control Human gDNA からライブラリーを調製した。ライブラリー増幅後、AMPure XP のプロトコルに従ってライブラリーを精製して一定量を TE バッファーで 5 ng / μ l に希釈し、うち 1 μ l を Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis チップ (Agilent Technologies) にロードした。青線は 300 bp プロトコルで調製したライブラリー、赤線は 450 bp プロトコルで調製したライブラリーを示している。

ライブラリー調製の改良

低濃度サンプルから NGS ライブラリーを調製すると、多様性に欠けるライブラリープールになりうる可能性がある。インプット液量が少ないことで、機械的なせん断時に受けるテンプレートのダメージにより、さらに多様性を損なうことにつながる。この問題を解決するため、ThruPLEX HV PLUS のライブラリー調製システムは、30 μ l という大容量のインプット液量に対応できる酵素フラグメンテーションを採用している。

低濃度のサンプルでライブラリー調製を開始した場合、収量を増やすため、シーケンス可能なライブラリープールの濃縮、および PCR 増幅の必要があるが、GC 含有の高い領域には強固な二次構造があり、熱変性や増幅への抵抗性を示すことで、PCR バイアスが生じる可能性がある。このバイアスは、低収量、不均一なカバレッジ、目的領域におけるカバレッジ深度の低下につながる。ThruPLEX HV PLUS は、キットの改変とワークフローの最適化によってバイアスを除去し、GC 含有量が非常に多い領域でのカバレッジを大幅に改善することで、正確なサンプル解析を可能にした。

インプット量に左右されない均一なライブラリーカバレッジ

シーケンスライブラリーは、インプットサンプルを正確に解析するため、サンプル全体を確実にかつ相対的にカバーする必要がある。インプット濃度が低くなると、カバレッジの均一性も低くなり、サンプルの正確な解析がより困難になる。また、低濃度のサンプルでは再現性が損なわれる可能性もある。ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS キットでは、インプット量に左右されない均一なカバレッジを実現している (図 3)。ThruPLEX HV PLUS キットの重要なポイントとして、推奨範囲内の最低インプット量である 5 ng でも優れた再現性を示しているという点が挙げられる (図 3)。

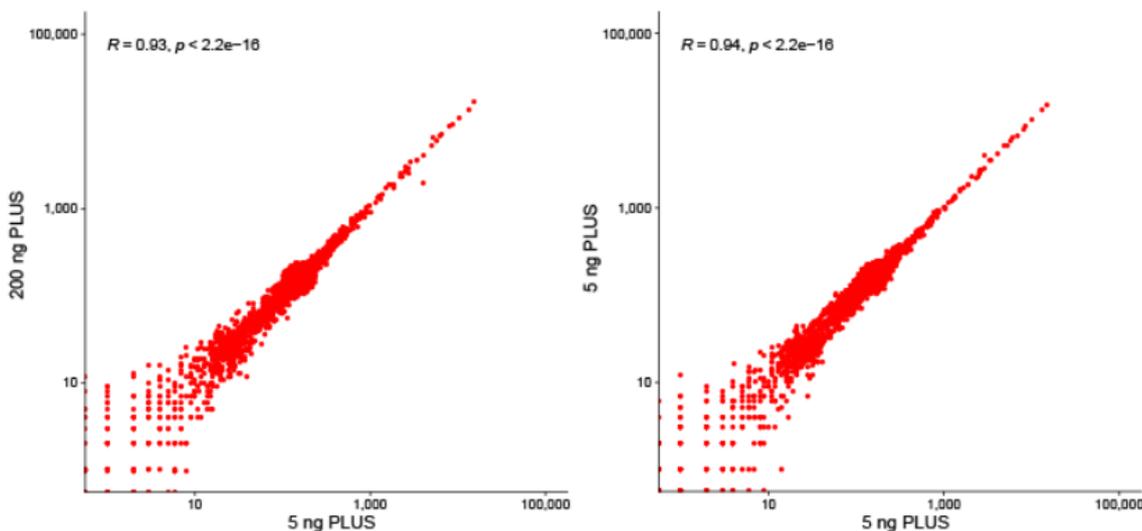


図 3. インプット量に左右されない高い再現性と均一なカバレッジ

5 ng および 200 ng の NA12878 DNA を用いて ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS でライブラリー調製し、500 万リードにダウンサンプリングした複製ライブラリーの相関図である。hg19 の各 100 kb 領域のカバレッジをインプット量ごとに比較した。独立した 2 つの 5 ng ライブラリー (右) と、5 ng と 200 ng の 2 つの異なるスタートインプット量 (左) のライブラリーの比較により、このシステムの高い再現性が実証された。

他社より優れたライブラリーカバレッジの均一性

全ゲノムシーケンスにおいて、ゲノム全体のカバレッジを均一にするためには、高い多様性を持つライブラリー調製が重要となる。A社キットおよびB社キットと比較すると、ThruPLEX DNA-Seq HV PLUSで調製したライブラリーは、理想的な正規化カバレッジにより近いカバレッジを示している（図4）。中くらいのGC含量では、3つのキットすべてが同等の性能を示しているが、GC含量が増加するにつれ、ThruPLEX DNA-Seq HV PLUSキットのデータは理想的な正規化カバレッジに近い値を示すのに対し、A社およびB社キットのデータは大きく乖離している。これは、5 ng および 50 ng のサンプルインプット量でも同様であり、サンプルインプット量にかかわらずライブラリーの均一なカバレッジを実現できるという ThruPLEX HV PLUS の利点が顕著に表れている（表2）。

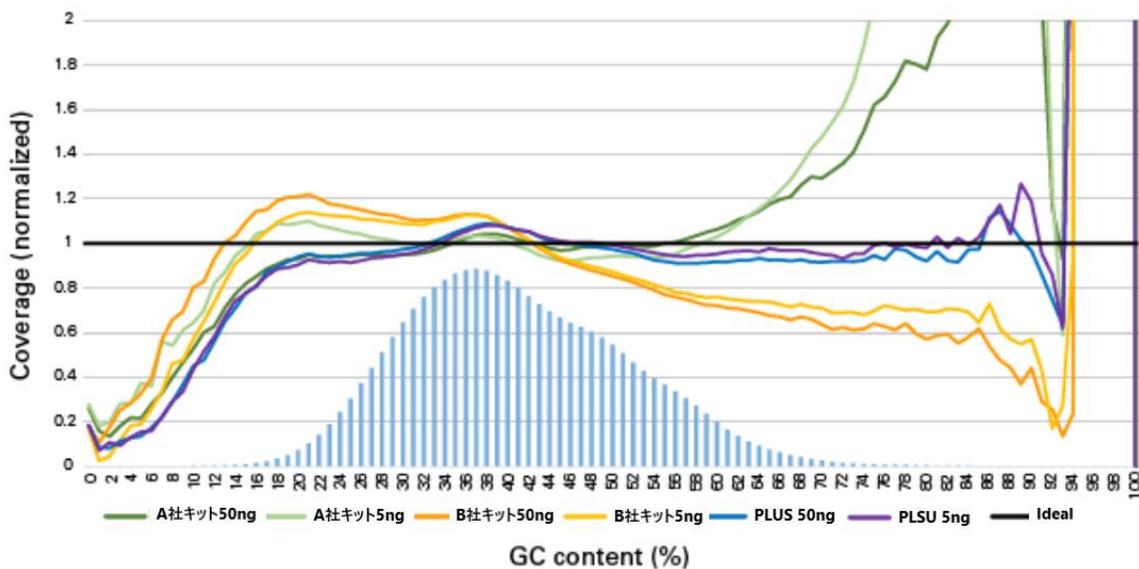


図4. 優れたカバレッジの均一性

NA12878gDNAを5 ng および 50 ng 使用し、3回に分けてライブラリーを調製した。ライブラリーはThruPLEX DNA-Seq HV PLUS、A社キット、B社キットそれぞれのプロトコルに従い調製した。NextSeq® 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles) を用いてペアエンドシーケンスを行い、総リード数は500万リードにダウンサンプリングした。青色の縦軸は、100 bp 領域において予想されるGC含量分布を表している。

	Input	Total reads aligned	% reads aligned	% chimera	% duplicate
ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS	50 ng	4.83E+06	96.69%	0.49%	0.75%
	5 ng	4.84E+06	96.73%	0.50%	0.80%
B社キット	50 ng	4.78E+06	95.86%	1.38%	0.89%
	5 ng	4.79E+06	96.16%	1.68%	1.06%
A社キット	50 ng	4.76E+06	95.55%	1.71%	1.24%
	5 ng	4.71E+06	94.80%	1.06%	1.47%

表2. 断片化ステップを持つ他社ライブラリー調製キットとの比較

サンプルインプット量は 50 ng または 5 ng である。% reads aligned は、参照ゲノム配列にアラインメントされたリードの割合を示す。% chimera は、ゲノムの二つの異なる部位にアラインメントされたリードの割合を示す。% duplicate は、PCR によるライブラリー調製の際に生じる、1 つの DNA フラグメントを由来とするリードの割合を示す。

まとめ

ThruPLEX HV PLUS キットは、ThruPLEX HV シリーズの最新バージョンである。ThruPLEX HV シリーズは、最大 200 ng / 30µl のインプット量から、高い多様性と均一な GC カバレッジを備えた DNA ライブラリーを調製するために設計・最適化されている。ワークフローの最適化、改良、さらに ThruPLEX HV PLUS Enzymatic Fragmentation Module が付加されたことで、ThruPLEX HV PLUS キットは、ThruPLEX HV のエンドリペアのステップと並行して、ThruPLEX HV PLUS Enzymatic Fragmentation Module に含まれる酵素により、サイズ調整可能なサンプル DNA の酵素断片化を行い、シングルチューブで、反応時間は約 2.5 時間、ハンズオンタイムはわずか 15 分という短時間で、NGS ライブラリーを調製する。ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS は、A 社キットおよび B 社キットとの直接比較実験において、高い GC 含量領域でのカバレッジが優れていることを示している。ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS は、効率性、簡便性、信頼性に優れた 1 チューブのワークフローを提供し、難易度の高い全ゲノムシーケンス実験に適している。

方法

DNA 調製

ヒトゲノム DNA (NA12878) の濃度は、Qubit 2.0 Fluorometer with Quant-IT dsDNA Assay Kit, high sensitivity (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて定量した。

ライブラリー調製

ライブラリーは、[ThruPLEX DNA-Seq HV PLUS](#)、A 社キット、B 社キットを用いて、各プロトコールに従い調製した。ライブラリーはすべて、デュアルインデックスを用いて調製した。増幅されたライブラリーは、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製され、全ゲノムシーケンス (WGS) 用の Low TE バッファーで溶出された。精製されたライブラリーサイズは、High Sensitivity DNA Reagents を用いて Agilent 2100 BioAnalyzer で算出した。ライブラリーは、高感度の Qubit 2.0 Fluorometer と Quant-IT dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて定量した。

イルミナシーケンス

PCR 増幅され定量されたライブラリーをプールし、NextSeq® 500/550 v2.5 フローセルにロードしてシーケンスを行った。ライブラリーは、イルミナ社推奨のローディング濃度に従いロードした。

データ解析

生シーケンスリードは、seqtk (v1.3-r106) を用いて、全サンプルで同数になるようにダウンサンプルし、

trimmomatic (v0.36)を用いて、アダプターや低品質のベースを除去する処理を行った。Bowtie2 (v2.3.4.3)を用いて、デフォルトのパラメーターで参照ゲノム UCSC hg19 にアライメントした。得られた SAM ファイルは、Picard SortSam (v2.18.3)を用いてソートし、samtools view (v1.8)を用いて BAM ファイルに変換した。Duplicate リードは、ソートした BAM ファイルから Picard MarkDuplicates (v2.18.3)を用いて識別・マークし、Picard AlignmentSummaryMetrics (v2.18.3)、Picard CollectInsertSizeMetrics (v2.18.3)、Picard CollectGcBiasMetrics (v2.18.3)、Picard CollectWgsMetrics (v2.18.3) を用いてアライメント、インサートサイズ、GC バイアス、様々な WGS マトリックスを集めるためのインプットとして使用した。

英語版オリジナルテクニカルノートは[こちら](#)

関連製品

製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
ThruPLEX[®] DNA-Seq HV PLUS Kit	24 回	R400782	¥111,000
	96 回	R400783	¥390,000
ThruPLEX[®] Tag-Seq HV PLUS Kit	24 回	R400784	¥156,000
	96 回	R400785	¥546,000