

Q800R2 による機械的 DNA 断片化

Qsonica 社 Q800R2_Illumina TruSeq Library Preparation Kit の DNA 断片化への使用

はじめに

Illumina 社の、TruSeq Nano DNA、TruSeq DNA PCR-Free および TruSeq Exome Library Preparation Kits を含む次世代シーケンス(NGS)キットでは機械的な DNA の断片化が求められます。

現在のところ、Illumina 社が DNA 断片化に使用可能だと認めている装置は Covaris 社 Ultrasonicator のみです。Covaris 社 Ultrasonicator が利用できない場合や、購入が難しい場合に、大きな課題となります。この課題に取り組むため、Illumina 社は Qsonica 社の Q800R2 を使用して DNA 断片化を検証しました。

Q800R2 は、Covaris 社 Ultrasonicator と同様に、高い強度の超音波を利用し、DNA サンプルを様々なサイズに断片化します。

このテクニカルノートは、Illumina 社のライブラリー調製プロトコルにおいて、DNA 断片化における Q800R2 の有用性を試験・証明するために実施された研究の結果および手法を示しています。特定サイズの DNA 断片を調製する設定を検証・同定するとともに、断片化の再現性を評価し、また結果として得られたライブラリーのシーケンシングを行いデータの品質評価を行いました。

Q800R2 は、断片化サイズのコントロールや再現性に極めて優れており、高品質なシーケンシングデータが得られるライブラリー調製に使用できることが明らかとなりました。

材料および方法

サンプル破碎およびライブラリー調整

ヒトリンパ球細胞株(Coriell Institute for Medical Research, NA12878)から DNA サンプルを調製(QS1-QS4)しました。

平均 350bp の断片を得るため、サンプルをポリプロピレン製チューブに入れ Q800R2(全て同じ設定、Table1 参照)を用いて超音波処理を行いました。今回は Qsonica 社のチューブホルダー(カタログ番号: 4256)を使用しましたが、サンプル種や処理量に合わせて様々なオプションが用意されています(Table4)。

得られたサンプルに対して、High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit(Advanced Analytica 社 カタログ番号: DNF-474)を用い、サイズおよびサイズの均一性について確認しました。



Fig 1: Q800R-Q800R は、DNA 断片サイズのコントロールや再現性に優れ、Illumina 社の Library Preparation Kit に対応します

また、TruSeq Nano DNA Library Preparation Kit (Illumina, Cat No. FC-121-4001)を使用して 4 つのライブラリーを調製し、Fragment Analyzer で再度分析を行いました。

シーケンシングおよび予備データ分析

これらのライブラリーは、HiSeq 2500 システムの Rapid run モード (ペアエンドの 2×76bp) で、HiSeq Rapid SBS Kit v2(Illumina 社 カタログ番号: FC-402-4023)を用いてシーケンスされました。

Q30 スコア(Quality Score)の算出含む予備データ解析は、クラウドベースのゲノムコンピューティングプラットフォーム、BaseSpace® Sequence Hub を用いて行いました。

Table 1: ライブラリー複製(QS1-QS4)のための Q800R の設定

パラメーター	設定
標的断片サイズ	350bp
サンプル容量	52.5μL
全 DNA インプット	105ng
DNA 濃度	2ng/μL
パルス(on/off)	15 秒/15 秒
振幅(Amplitude)	20%
温度	4℃
総処理時間	22 分
a 設定および処理時間は特定のアプリケーションおよび使用するバッファーに対して最適化する必要があります。	

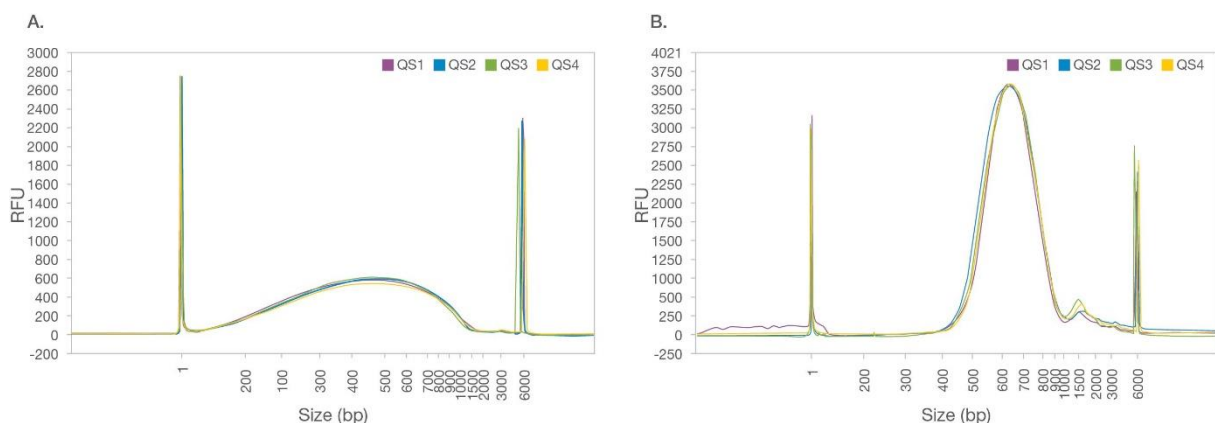


Fig 2: Q800R の断片化再現性 - A. DNA サンプル QS1-QS4 を Q800R で超音波処理し、Fragment Analyzer で解析 B. TruSeq Nano DNA Library Prep Kit によりライブラリーを調製し、Fragment Analyzer で解析

結果

断片サイズの均一性と断片化の再現性

断片サイズの均一性と断片化の再現性評価のため、QS1-QS4 のサンプルに対し、Q800R2 での超音波処理処理と、TruSeq Nano library preparation 処理について、Fragment Analyzer で評価を行いました。その結果、超音波処理後とライブラリー調製後の 2 回とも、平均の断片サイズに対して高い再現性を示すことが明らかとなりました (Table 2)。

Table 2: QS1-QS4 の平均断片およびライブラリーサイズ

	QS1	QS2	QS3	QS4
Avg Size After Sonication	421bp	428bp	426bp	423bp
Avg Size After Library Prep	553bp	544bp	564bp	554bp

Q800R 超音波処理の Fragment Analyzer による結果は、Covaris でも通常見られるような、広いサイズ範囲を示しました。断片の平均サイズはおおよそ 420bp でした。ビーズ精製などライブラリー調製プロセスにおける後の工程において、断片サイズはさらに 350bp 程度にまで範囲が絞られます。

シーケンシングデータの品質

各ライブラリから得られたシーケンシングデータの品質について、Q30 スコアおよびパーセントアライメントメトリックスにより評価しました。Q800R2 超音波処理で調製されたライブラリーは高い再現性があり、全てのライブラリーにおいて、リードのアラインメントの割合は 94% 以上で、Q30 以上でベースコールされた塩基の割合は $\geq 94\%$ でした。

 Q30 スコア: エラーの確率 (1000 のうち 1) 以上でベースコールされた塩基の割合

 NGS 品質スコアについての詳細についてはテクニカルノート (https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf) をご覧ください。

Table 3: シーケンシングデータ品質

Statistics ^a	QS1	QS2	QS3	QS4
Percent Alignment	94.9%	94.7%	94.6%	95.1%
Percent $\geq$ Q30	94.5%	94.4%	94.4%	94.8%
Median Fragment Length	365bp	351bp	364bp	359bp

a. 本表はリード 1 およびリード 2 の平均を示しています

要約

Q800R2 は Illumina 社の Illumina library prep kit プロトコルの断片化に使用することができました。また、Q800R2 は、極めて優れた再現性を有しており、高い品質のシーケンシングデータが得られることが明らかとなりました。現在、TruSeq Nano DNA, TruSeq DNA PCR-Free, and TruSeq Exome Library Prep Kits の DNA 断片化プロセスにおいては、Covaris Ultrasonicator が使用されていますが、この結果から、Q800R2 が信頼性のある代替手段となることが示されました。これにより、Illumina 社のライブラリー調製プロトコルが、とてもフレキシブルになりました。

Table 4

Description ^a	Sample Tube Size	Number
8 Tube Holder (White)	1.5mL polystyrene (Evergreen) ^b	4256
12 Tube Holder (black)	0.5mL thin walled PCR tubes	4255
18 Tube Holder (blue)	0.3mL thin walled PCR tubes	4263
12 Tube Holder (grey)	0.5mL brandtech tubes	4263

a. 標準のチューブラックのほか、ユーザーの仕様に合わせカスタムが可能です

b. Evergreen Scientific: 214-3721-010 (チューブ), 300-2911-020 (キャップ) を推奨します。

 Q800R の詳細は、弊社 WEB サイト (<https://www.wakenbtch.co.jp/product/maker/qsonica>) をご覧ください。