

エッペンドルフ twin.tec® PCR プレート 96 LoBindは転写産物種と NGSライブラリのリード数を増加させる

Hanae A. Henke¹, Björn Rotter²

¹Eppendorf AG, Hamburg, Germany; ²GenXpro GmbH, Frankfurt am Main, Germany

Abstract

シーケンス解析はライフサイエンスにおいて、ますます重要な技術となっています。多重配列アラインメントによる方法は存在しますが、高品質なサンプルを必要とし、多くの場合スタート時の材料を大量に用意しなければなりません。現在最も高度な方法は、次世代シーケンシング(NGS)です。しかしその複雑さのため、多くの要因が進行を妨げたり、最終的なライブラリの品質だけではなく量までも損ねてしまいます。これらの多数ある要因の中で、消耗品の選定は見逃されがちです。私たちは低

吸着の特性を持つエッペンドルフtwin.tec PCR プレート LoBind 96 (エッペンドルフLoBind®)と、

エッペンドルフ twin.tec PCRプレート96 (スタンダード)を用いてシーケンシング解析したときの、リードの深さと数、転写産物種の数を比較しました。エッペンドルフのLoBind 消耗品の優位性を証明するため、2つのNGSライブラリ (10 ngと50 ngのtotal RNAを使用)を両タイプのプレートを用いて準備し、シーケンス解析を行ってデータを比較しまし

Introduction

昨今、シーケンス解析はほぼ全ての研究分野において最も重要な技術の一つです。様々なアプローチが存在し、1977年に発明されたクラシックなサンガー法は過去数十年にわたって発展してきました。これらの方法の中でも、NGSは最も高度であり、シーケンシング1回の実行で[1]1.8テラベースまで読むことができます。NGS用ライブラリの準備は長い時間と多段階のプロセスが必要となります。通常、主に4つのステップからなります。最初にDNA試料を断片化し、続いて断片化したDNA末端部を酵素により修復・修飾します。

第三段階ではオリゴヌクレオチドを断片の両端に付加し、サンプルの識別とユニバーサルプライマーによる増幅が可能になります。4段階目でPCRを重ね、ライブラリのボリュームを増やします。ライブラリの品質は1回のシーケンシング後に多くの測定法によって評価できます。一般的に用いられる指標はリード数であり、全ての転写産物種を取得するためにできる限りリード数が多いことが求められます(適正なクラスター密度において)。もう一つの指標は、異なる転写産物種の数(RNAシーケンシングの場合)であり、シーケンシングデータの信憑性を測るために用いられます。

シーケンシングを成功させるために必要なもう一つの要素は、サンプルの品質です。サンプルは高純度で大量にあるのが理想です。しかし現実には、FFPE(ホルマリン固定パラフィン包埋)や法医学的試料由来のサンプルなどは極めて限られ、低品質であることが多くなります。こうしたサンプルを取り扱うための方法の一つがMACE (Massive Analysis of cDNA Ends)です[2]。MACEの場合、転写分子一つにつき1リードのみでシーケンスされます。短く、希少な転写産物は全長RNA-Seqと比較して10~20倍シーケンシング深度を低くして識別できます。さらに、鎖長をベースとした標準化を必要としません[3]。そのため、このテクニックはNGSシーケンシングが難しいサンプルに用いることができます。TrueQuantを用いれば、シーケンシングノイズや低品質なリードを取り除くことができます。低量で繊細なサンプルの場合、高い品質のクラスター形成と優れたシーケンシング深度とカバレッジはデータの信頼性のために欠かせない要素となります。純度やリード数、転写産物種の確保といった重要なポイントを向上することができれば、より良いシーケンス結果につながります。高い品質のNGSライブラリを得る一つの方法は、DNAを保護する特別な消耗品を使用することです。標準的なラボのポリプロピレン消耗品によって、DNAの変性やマルチマー形成、短いDNA断片のプ

ラスチック表面への吸着が起こり得るといった現象が、数多くの研究から判明しています[4, 5]。さらに、プラスチックからの溶出物が受容体結合の阻害、光度計の測定値増加、酵素活性の変化といったサンプルへの悪影響につながることも判明しています[6]。ポリアロマー等のようなDNAに影響しないプラスチックをラボの消耗品素材として使用することは、こうした問題を解決する一つの方法です[4]。NGSワークフローにおける低吸着性の効果を証明するため、低吸着性を特徴とするEppendorf twin.tec PCR plate 96 LoBind (Eppendorf LoBind)とEppendorf twin.tec PCR plate 96 (standard)を用いて、NGSライブラリの調製を行いました。次にこれらの性能をシーケンシングからの読取り数と転写産物品種の種類を基に比較しました。

Materials and Methods

Eppendorf LoBindとstandard PCR plateによるqPCRへの影響の比較 LoBind素材がPCRに干渉しないことを確認するため、Eppendorf twin.tec PCR plate 96 LoBind, semi-skirted (Eppendorf LoBind; Lot. No: E161876M; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)とEppendorf twin.tec PCR plate 96, semi-skirted (standard; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)を用いてqPCR効率の比較を行いました。20 μ Lの反応ボリュームで、Hot MOL-Pol EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (projudis GmbH, Butzbach, Germany)を用いました。使用されたテンプレートは、purified via SPRIselect[®] SPRI bead-based size selection (Beckman Coulter, California, USA)を用いて精製した、1 μ LのプールされたNGSライブラリ (0.1 ng/ μ L)です。サンプルをEppendorf LoBindもしくはstandard plateを用いて用意し、MicroAmp[®] Fast Optical 48-well reaction plate (REF: 4375816, Applied Biosystems[®], California, USA)に集約してqPCR解析を行いました。サイクラーはApplied Bio-systems StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Bio-systems, California, USA)を使用しました。

Eppendorf LoBind と standard plateを用いた初代細胞NGSライブラリのシーケンシング効率の比較 初代培養のHUVEC細胞から精製した10ngもしくは50ngのtotal RNAをサンプルに、MACEプロトコル (GenXpro GmbH, Frankfurt a. M., Germany) に従ってNGSライブラリを用意しました。cDNA合成やその後の全ステップにおいてEppendorf LoBind とstandard plateを用いました。両プレートタイプともに並行して処理され、それぞれ3回反復しました。10回のPCRを両グループで行いました。全ての産物のシーケンシングは同一のIllumina[®] NextSeq[®] 500 lane (Illumina, Inc., California, USA)によって行われました。アダプター配列は75 bpsです。全シーケンスデータからノイズと低品質のリードをTrueQuant method (GenXpro GmbH, Frankfurt a., Germany) によって除きました。全てのMACE シーケンシングデータは、novoalign (<http://novocraft.com>)のGenXpro annotation pipelineを用いて、ヒトゲノム hg19上でannotateされました。遺伝子情報を得るため、全てのannotation 座標はRefseq-trackを用いてアラインメントされました。全シーケンス済み分子数に対して各転写産物数の割合に106 (TPM=tags per million)を掛けて、データの標準化を行いま

Results and Discussion

Eppendorf LoBindとstandard plateを用いたqPCR効率の比較
Eppendorf LoBindの低吸着性がPCRのパフォーマンスに影響しないことを確認するため、Eppendorf LoBindとstandard plateでの増幅率は同等でなければなりません。同じNGSライブラリをテンプレートとして両プレートタイプを用いてqPCR実験を行いました。Figure 1はEppendorf LoBindとstandard plateでの目的サンプルの増幅率は、 C_t 値はそれぞれ8.83と8.81となりほぼ同じ値となりました。

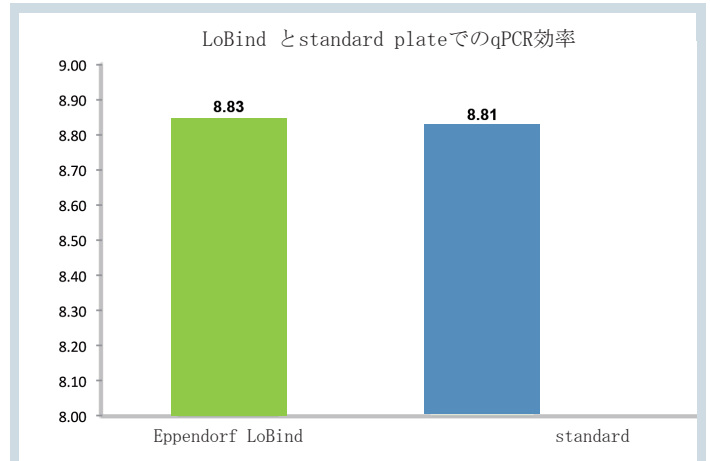


Figure 1: Eppendorf LoBindとstandard plateにおけるPCR増幅率の比較 (n=3)。

Eppendorf Lobind とstandard plateを用いた初代細胞NGSライブラリのシーケンシング効率の比較

Eppendorf Lobind とstandard plateを用いたシーケンシング効率をするため、10ngと50ngのtotal RNAからNGSライブラリを調製しました。続いて、両方のライブラリをフローセルの同じレーンでシーケンスを行いました。全てのシーケンスデータはTrueQuant法を用いてノイズや低品質なリードを除去しました。結果としてtotal RNA 10ngよりEppendorf LoBindで調製されたライブラリからは平均549,165のリード数、standard plateからは平均442,699のリード数が得られました。このデータはEppendorf Lobindを用いた場合のリード数が、standard plateを用いた場合のリード数を約20%上回ることを示しました。同様に、50ngのtotal RNA群でも調べたところ、Eppendorf Lobindを用いた場合のリード数は平均2,836,281、standard plateを用いた場合のリード数は2,184,589となり、Eppendorf LoBindが約23%上回りました。この結果は、NGSライブラリの調製をEppendorf LoBind plateで行った方がより多くの生データが得られるため、評価するための余裕が生まれるとともに、ライブラリにある必要な全ての情報が得られる確率を高めます。

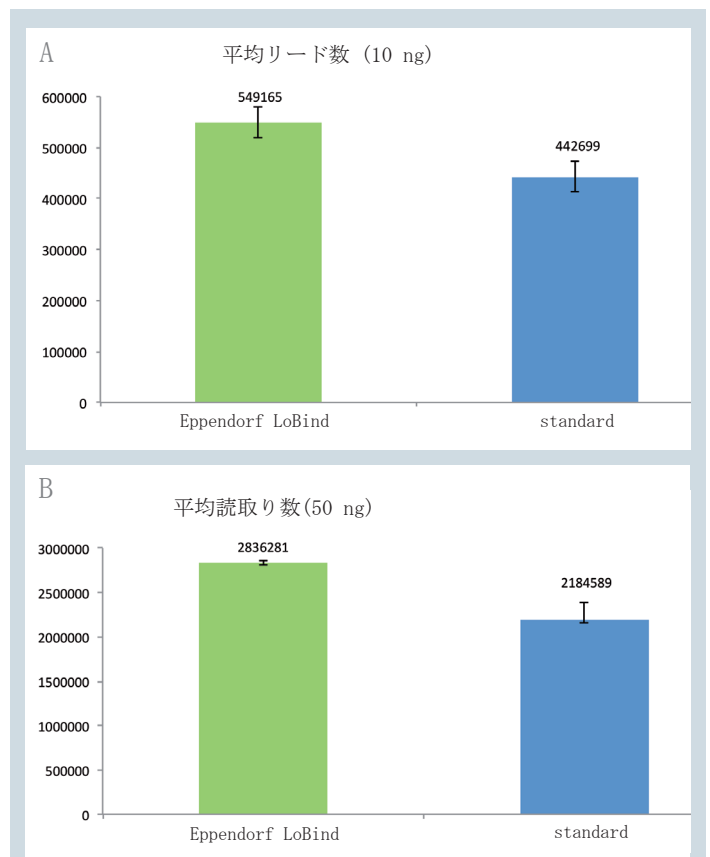
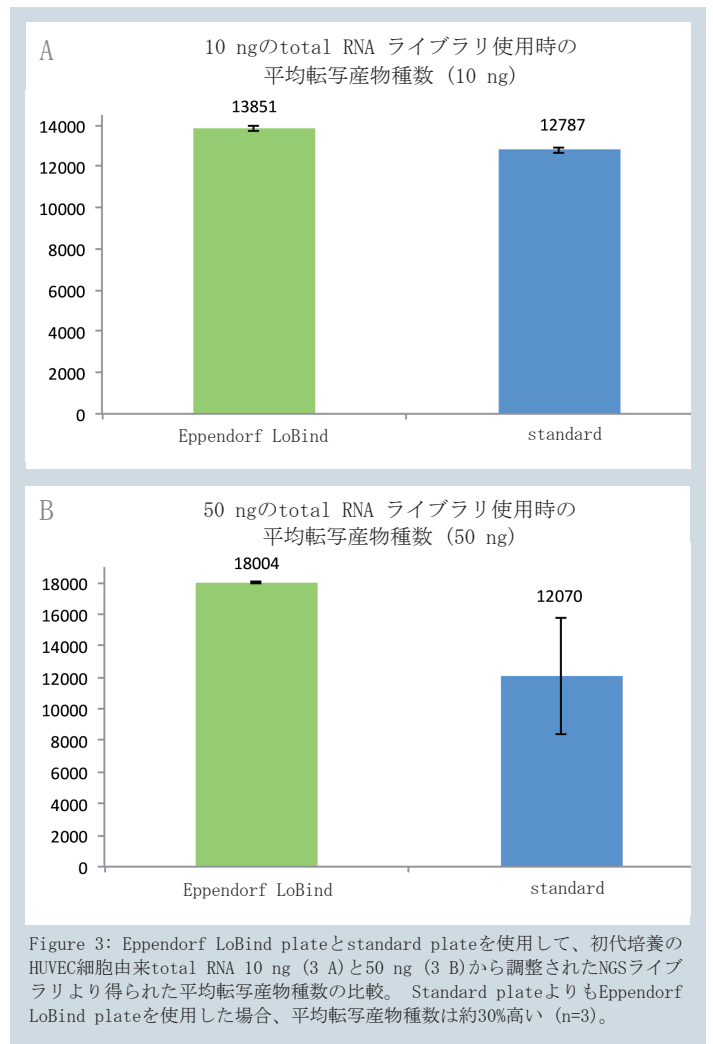


図2: Eppendorf LoBind plateとstandard plateを使用して、初代培養のHUVEC細胞total RNAから調製した10 ng (2 A)と50 ng (2 B)のNGSライブラリから得られた平均リード数。Standard plateよりもEppendorf LoBind plateの方が平均リード数は23%高い (n=3)。

評価平均リード深度だけでなく、検出される異なる転写産物種の数もシーケンスの質の評価となります。より多くの異なる転写産物種が同定されるほど、シーケンスデータはより網羅的になるため、データの評価は高まります。NGSライブラリの調製にEppendorf LoBindを使用した方が、転写産物種が多くなることが実証されました。ライブラリのセットアップのため10ngのtotal RNAから得られる異なる転写産物種は、standard plateでは12,800得られたのに対し、Eppendorf LoBindでは13,800得られ、Eppendorf LoBind plateが転写産物のバリエーションを保持するのに有効なことがわかりました (figure 3 A)。このメリットはスタートのサンプル量が増えた場合には (今回では50ngのtotal RNA) さらに明確な結果となり、standard plateでは得られた転写産物種は 12,000であったのに対し、Eppendorf LoBindでは18,000と約30%多くの転写産物種が得られました (figure 3 B)。



Conclusion

Standard plateの代わりにEppendorf LoBind plateを用いたNGSライブラリの調製は、多くのメリットがあることが判明しました。両タイプのプレートを用いたPCR効率は同等である一方、シーケンスデータ結果の質と量は向上しました。さらに、Eppendorf LoBind plateを使用することで、より低品質なNGSライブラリにおいて効果を発揮することが考えられます。Standard plateを使用した場合と比較して、Eppendorf LoBind Plateで調製されたライブラリのシーケン

シングによって、より多くのリード数と転写産物種が同定されました。このことから、Eppendorf LoBind plateを使用して低品質のNGSライブラリを調製した場合、

高品質なライブラリを用いた場合と引けをとらないデータが得られることも考えられます。Eppendorf LoBind plateを使用すれば、より少ない繰り返し作業と手間でライブラリの調製を行うことができます。これは低品質または少量の開始サンプルを使用せざるを得ない場合に、特にメリットがあります。Eppendorf LoBind plateを使用してライブラリの調製

Acknowledgement

本プロジェクトにおいて、GenXpro GmbHのDr. Björn Rotterと彼のチームから、熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

Literature

- [1] www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html
- [2] Hofer TP, Zawad AM, Frankenberger M, Skokann K, Satzl AA, Gesierich W, Schuberth M, Levin J, Danek A, Rotter B, Heine GH, Ziegler-Heitbrook L. Characterization of subsets of the CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF-receptor mutation. (CD16+単球サブセットの定性分析:肉芽腫性炎症とM-CSF受容体突然変異の影響) Blood 2015 Oct 6. Pii: blood-2015-06-651331
- [3] <http://genxpro.net/sequencing/transcriptome/mace-massive-analysis-of-cdna-ends/>
- [4] Gaillard C, Strauss F. Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. (DNAのPP管への吸着およびDNA断片短鎖の変性防止)
Science, Technical Tips online 1998, Vol. 3: 63-65
- [5] Belotserkovskii BP. Polypropylene Tube Surfaces May Induce Denaturation and Multimerization of DNA. (PP管表面でDNA変性と多量体化が誘導される)
Science, Technical comments 1996, Vol. 271: 222-223
- [6] Grzeskowiak R, Gerke N. Leachables: Minimizing the Influence of Plastic Consumables on the Laboratory Workflows. (ラボワークフローにおけるプラスチック消耗品の影響軽減に関して)
エッペンドルフホワイトペーパー 26; www.eppendorf.com

オーダー関連情報

説明	Order no. international	Order no. North America
Eppendorf twin.tec® PCR plates 96 Eppendorf LoBind®, semi-skirted	0030 129.504	0030129504
Eppendorf twin.tec® PCR plates 96 Eppendorf LoBind®, skirted	0030 129.512	0030129512

国内代理店: www.eppendorf.com/contact
 Eppendorf AG · Barkhausenweg 1 · 22339 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com