

Application News

No. B52

マイクロチップ電気泳動法
Microchip Electrophoresis

次世代シーケンサー（NGS）ライブラリー Quality Control（QC）への応用

Application to Quality Control(QC) of Next Generation Sequencer (NGS)

次世代シーケンサー（NGS）は、その技術発展から de novo シーケンシング、変異・エクソーム・発現解析などに用途が広がっています。さらに要求される解析処理能力に応じて機種を選択することが可能なため急速に普及しています。用途や機種に関係なく共通している点として、良質なシーケンシング結果を得るためには NGS ライブラリーのサイズ分布と濃度を把握する必要があり、NGS を利用する上でそれらの Quality control (QC) は必要不可欠です。

これまで、NGS ライブラリーのサイズ分布確認にはアガロース電気泳動がその担い手として利用されてきました。また、濃度確認にはリアルタイム PCR 装置や蛍光分光光度計が必要とされてきました。

しかしながら、ライブラリー調製から QC までの操作は煩雑な手作業の連続であり、迅速、簡便、且つ安価な QC 方法が求められています。特に、Index タグ配列を用いた多検体同時シーケンシング技術の成熟に伴い QC を行うライブラリー数が増加傾向にあるため、その要望は一層高まりつつあります。

ここでは、この課題を解決するため自動電気泳動装置 MCE-202 MultiNA を用いた NGS ライブラリー QC への応用について、マウスの RNA シーケンス解析を例にご紹介いたします。

H. Kumagai Y. Sogabe

■ 分析方法

Experimental Procedure

【リアルタイム PCR との濃度定量結果の比較】

- ①マウスの TotalRNA（8 検体）は、Clontech 社 SMARTer Ultra Low RNA kit を使用し cDNA 増幅産物を調製。
- ②illumina 社のプロトコルに従い cDNA 増幅産物へのシェアリングを実施後、TruSeq DNA sample prep kit を使用し NGS ライブラリーを調製。
- ③MultiNA を用いて同ライブラリーを DNA-1000 キットで分析後、スミア解析ソフトウェア^{*1}によって濃度を定量。
- ④MultiNA での濃度定量結果と、同一サンプルでのリアルタイム PCR（島津製作所 GVP-9600）の濃度定量結果と比較。

【次世代シーケンサーを用いたシーケンシング】

- ①illumina 社 TruSeq RNA sample prep kit を使用し、マウスの NGS ライブラリー 4 検体を調製。
- ②MultiNA を用いて同ライブラリーを DNA-1000 キットで分析後、スミア解析ソフトウェアによってサイズ確認・定量を実施。
- ③illumina 社 HiSeq 1000 を用いてシーケンシングを実施。
※ライブラリー 4 検体は Index タグ配列により識別できるため、1 レーンのみを使用してシーケンシング。

【MultiNA 試薬／キット】

- ・DNA-1000 キット 島津製作所：P/N292-27911-91
- ・SYBR® Gold Life Technologies：S11494
- ・φ X174 DNA/HaeIII Markers Promega：G1761

*1：スミア解析ソフトウェアは MultiNA ソフトウェア ver.1.12 以上が必要です。

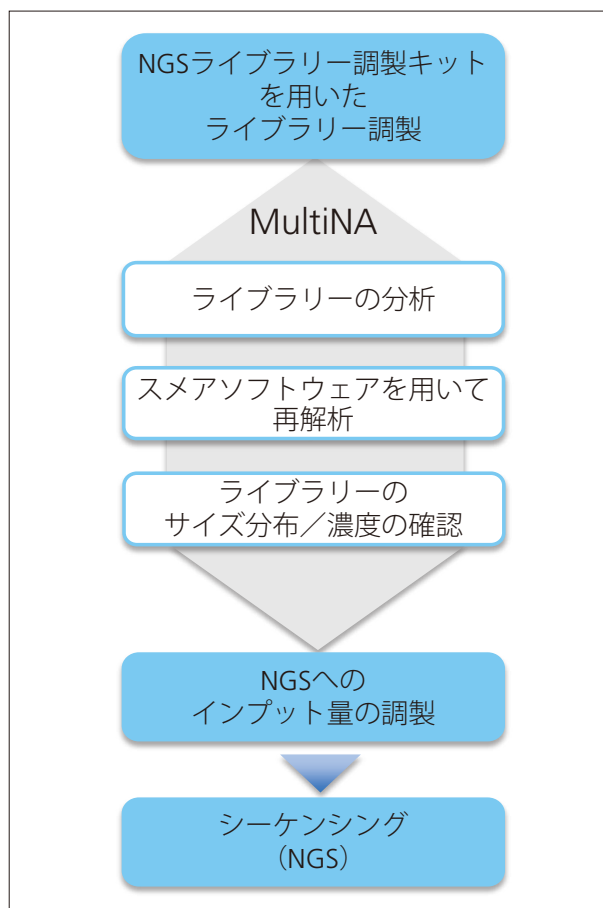


Fig. 1 NGS ライブラリーの Quality Control 手順
Experimental Procedure of QC of NGS Library

NGS ライブラリーの QC 工程において、MultiNA のスメア解析ソフトウェアを利用することでライブラリーの推定平均サイズ、濃度およびモル濃度を算出することができます (Fig. 2, 3)。リアルタイム PCR との定量比較では、MultiNA による定量濃度が相対的に低いものの安定した定量結果が得られました (Table 1)。

また、マウスの RNA シーケンシング結果においても充分なリード長と、Index タグ配列による各ライブラリー間で安定したリード比率を得ることができました (Table 2)。

これらの結果は、MultiNA を利用したライブラリー QC ではサイズ分布を確認するだけでなく、ルーチンに分析するライブラリーに対して定量も同時に実施できることを示唆しています。MultiNA では最大 108 ライブラリーまで泳動・解析を自動分析することが可能です。また、結果を得るまでの実作業時間は 10 ～ 20 分程度に短縮することができます。特に、NGS でライブラリーが増加した時、MultiNA をライブラリー QC に応用することで迅速かつ簡便な QC が可能となります。

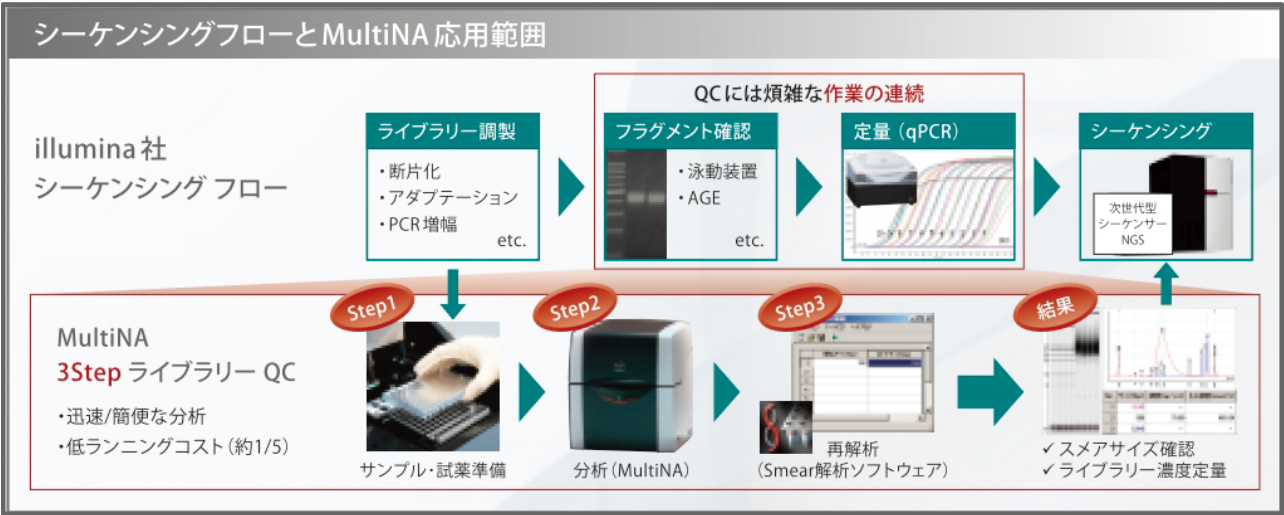


Fig. 2 NGS フローと MultiNA ライブラリー QC の応用範囲
The Application Range of the NGS Flow and the Library QC by MultiNA

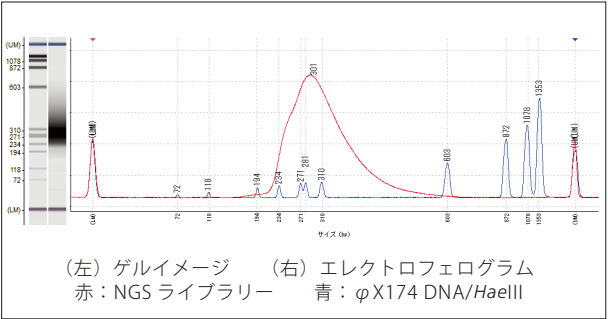


Fig. 3 NGS ライブラリーの泳動例
Electrophoresis of a NGS Library

Table 1 MultiNA とリアルタイム PCR の濃度定量結果^{*2}
The Concentration Fixed-quantity Result of MultiNA and the Real Time PCR

Library No.	MultiNA [nmol/L]	GVP-9600 (q-PCR) [nmol/L]	Ratio [MultiNA/GVP-9600]
1	121.1	167.3	72.4 %
2	126.9	145.1	87.5 %
3	54.1	57.8	93.6 %
4	214.0	292.3	73.2 %
5	187.4	226.8	82.6 %
6	166.3	229.3	72.5 %
7	206.0	256.8	80.2 %
8	158.7	181.9	87.3 %
Average			81.2% (CV 9.9%)

Table 2 MultiNA で QC を実施した 4 ライブラリーの NGS 結果^{*2}
The NGS Result of Four Libraries Which Carried Out QC by MultiNA

クラスタ密度	548 K / mm ²	総リード数	151.5 M reads
リード数 (フィルター処理後)	143.3 M reads	≥Q30 比率	95.9 %
4 ライブラリーのリード比率	21.2 % - 26.2 % (4ライブラリー/1レーンをIndexタグ配列でソート: 理論値25 %)		

*2: サンプルおよびデータご提供先 小原 収 先生
注 1) 本アプリケーションニュースは分析例の紹介であり、当社製品仕様の対象用途外での使用となります。分析結果を保証するものではありません。
注 2) ライブラリー調製時に PCR を実施しない場合や、ライブラリーの分布状況に依存して十分な検出感度が得られないことがあります。

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ MultiNA (マルチナ)
DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置

関連分野

＞ 低分子医薬品

＞ ライフサイエンス

＞ ゲノミクス

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ