

もっと簡単に、もっと確実に、NGS解析したい方は必読！

# NGS用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」を使用した DNA-seqアプリケーション集



タカラバイオの次世代シーケンス(NGS)用ライブラリー調製キット「ThruPLEX®」が、あなたの解析結果をより「真実」に近づけます

## ★ 掲載アプリケーション

### 1. 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 : 東京大学 定量生命科学研究所 白髭先生、坂東先生よりご提供

### 2. 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

### 3. 分子バーコード付ライブラリー調製キットThruPLEX® Tag-seq Kitを使用し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

## ▶ ThruPLEX®とは・・・

- ・ イルミナ社NGS装置用DNA-seq解析ライブラリー調製キット
- ・ わずか50 pg※のDNAからでも確実にライブラリー調製が可能
- ・ 面倒なビーズ精製は1回のみ、ハンズオンタイムはたったの15分
- ・ シンプルなワークフロー、1チューブで反応完了

※ThruPLEX Tag-seq KitのインプットDNA量は1 ng~です。

ThruPLEX®シリーズの製品情報は、本パンフレットの裏表紙をご覧ください ➡

## 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 : 東京大学 定量生命科学研究所 白髭先生、坂東先生よりご提供

### ■ 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ルをほぼ固定できた。

### ■ 使用した製品

| 製品名                   |
|-----------------------|
| ThruPLEX® DNA-seq Kit |

### ■ 実験ワークフロー

|                 |   |
|-----------------|---|
| 細胞クロスリンク        | 低吸着チューブを用いて10,000個または250,000個の網膜色素上皮(RPE)細胞を1%ホルマリンで固定  |
| 細胞溶解            | BSAを含むChIP Lysis Buffer に懸濁<br>※使用するバッファー量が多ならないように、当研究室では100 µlになるように調整している。   |
| クロマチン断片化        | 超音波細胞破碎装置Picoruptor (Diagenode社)でクロマチンの断片化<br>※培養細胞などで条件検討を行う。  |
| ChIP用抗体を用いた免疫沈降 | あらかじめ抗体(H3K4me3)を結合させたProtein A Magnetic Beadsと上記クロマチン画分を混合し、4°Cで一晩転倒攪拌後、RIPA Bufferでビーズを洗浄<br>※少数細胞の場合は、免疫沈降後の上清をInputとしてChIP DNAと同様に処理する。 |
| DNA溶出脱クロスリンク    | 0.5% SDS/TEで65°C、8時間以上インキュベート後、RNase A処理、Proteinase K処理により脱クロスリンク<br>※ビーズが含まれた状態で行う。  |
| DNA精製           | MinElute PCR Purification Kit(QIAGEN社)でDNA精製<br>※溶出液は2倍に薄めて10 µl x 2回で溶出する。   |
| NGS用ライブラリー調製    | 全量のChIP DNAを用いてThruPLEX® DNA-seq Kitでライブラリー調製<br>※ChIP DNAは、ThruPLEX DNA-seq Kitの最大持込容量10 µlになるように真空乾燥機で濃縮する。                               |
| シーケンス           | HiSeq 2500、65 bpシングルリード   |
| 情報解析            | DROMPA3で情報解析 ( <a href="https://github.com/rnakato/DROMPA3">https://github.com/rnakato/DROMPA3</a> )  |

# アプリケーション 1

## ■ 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 <sup>4</sup> 細胞 (H3K4me3)   | 30,823,404 | 21,336,878 (69.2%) | 6,697,451 (21.7%) | 2,789,075 (9.1%)    |
| 2.5 × 10 <sup>5</sup> 細胞 (H3K4me3) | 45,738,702 | 37,730,704 (82.5%) | 4,018,338 (8.8%)  | 3,989,660 (8.7%)    |

1 × 10<sup>4</sup>個または2.5 × 10<sup>5</sup>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 × 10<sup>4</sup>個の場合でもduplicate率は9.1%となり、細胞数が多い場合 (2.5 × 10<sup>5</sup>個) とほぼ同程度の割合となった。

## ■ ピーク検出結果



1 × 10<sup>4</sup>細胞から得られたH3K4me3の局在プロファイルは、2.5 × 10<sup>5</sup>細胞から得られたプロファイルと同様の精度の高いデータを得ることができた。

## ■ 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。

## 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

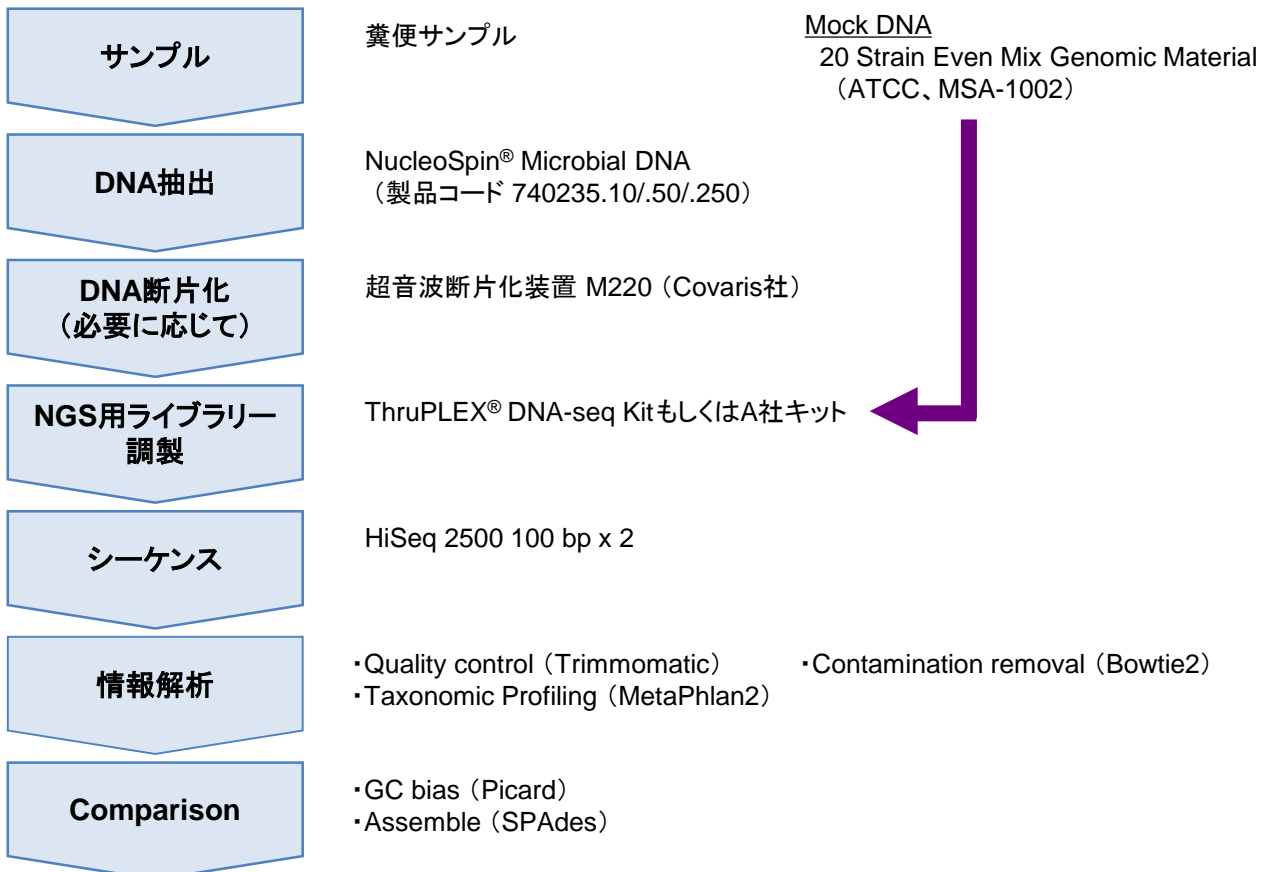
### ■ 実験の背景

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、様々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、A社ライブラリー調製キットとの比較も行った。

### ■ 使用した製品

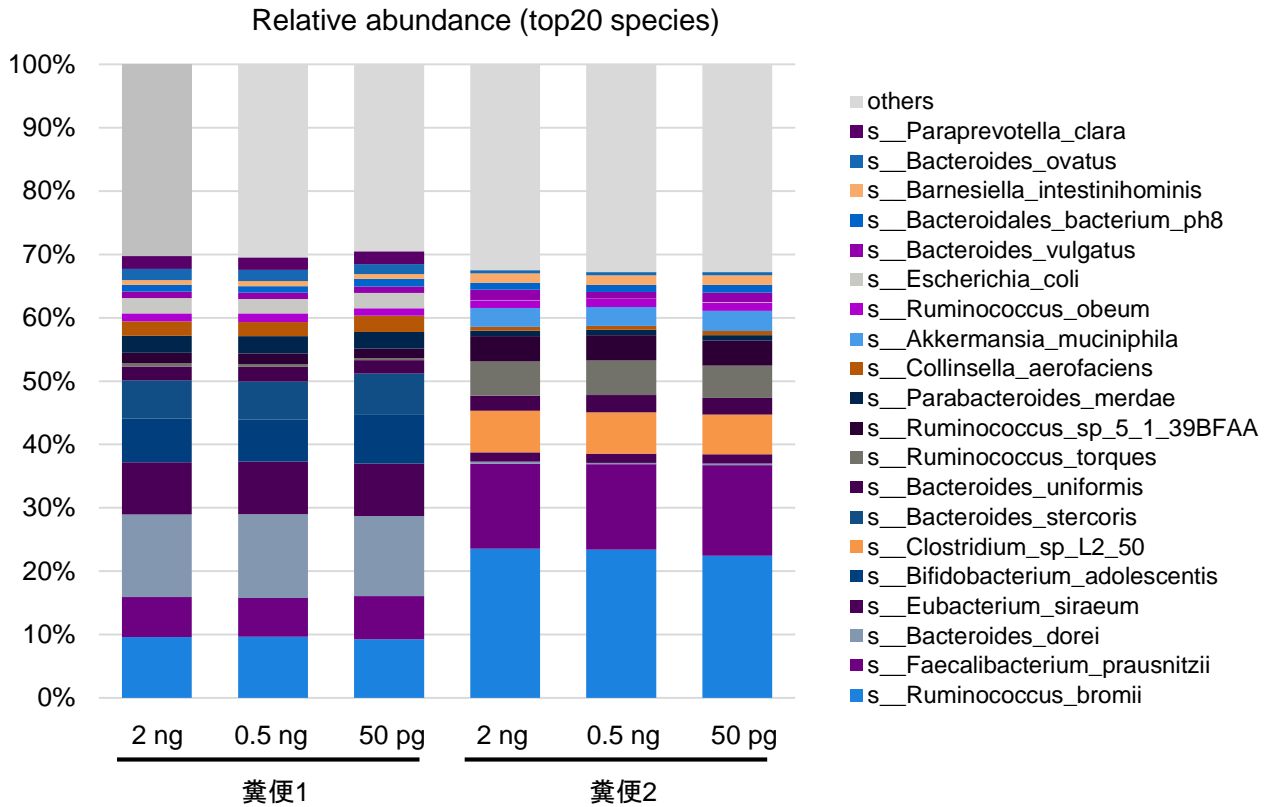
| 製品名                   |
|-----------------------|
| ThruPLEX® DNA-seq Kit |

### ■ 実験ワークフロー



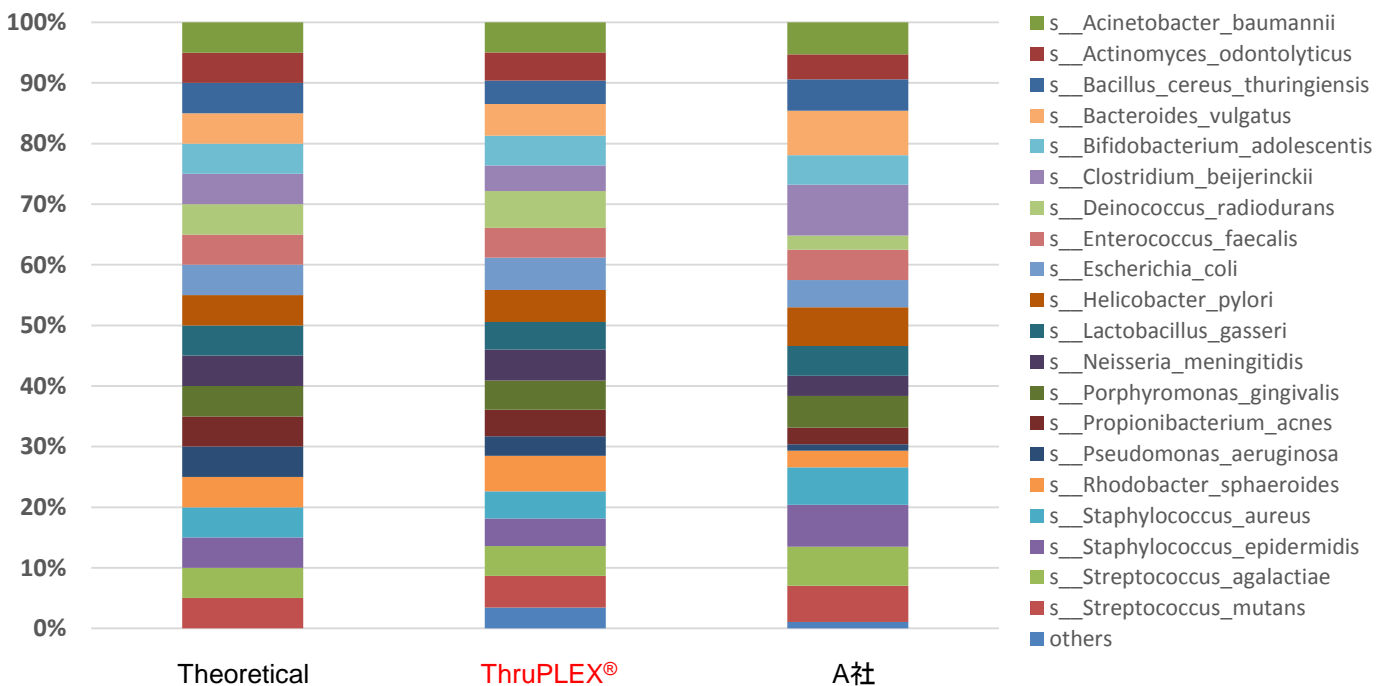
# アプリケーション 2

## ■ 様々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A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A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。

## 分子バーコード付ライブラリー調製キットThruPLEX® Tag-seq Kitを使用し 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

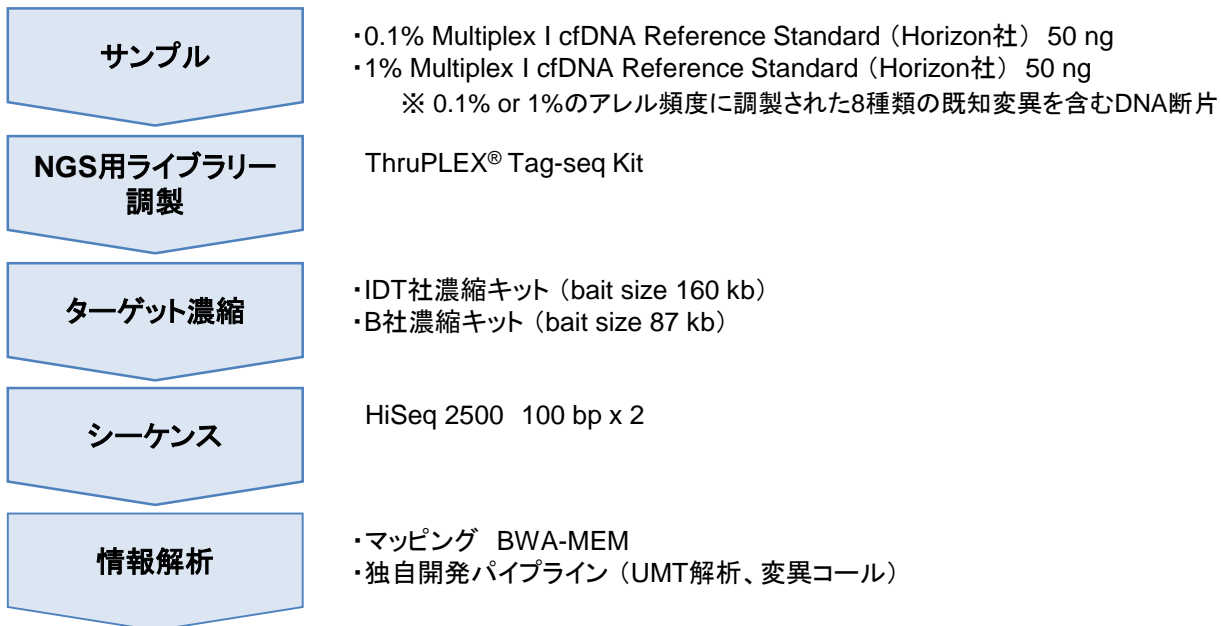
### ■ 実験の背景

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(UMT)を搭載したライブラリー調製キットである。UMT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B社濃縮キットを用いて評価した。

### ■ 使用した製品

| 製品名                   |
|-----------------------|
| ThruPLEX® Tag-seq Kit |

### ■ 実験ワークフロー



# アプリケーション 3

## ■ 変異遺伝子検出結果

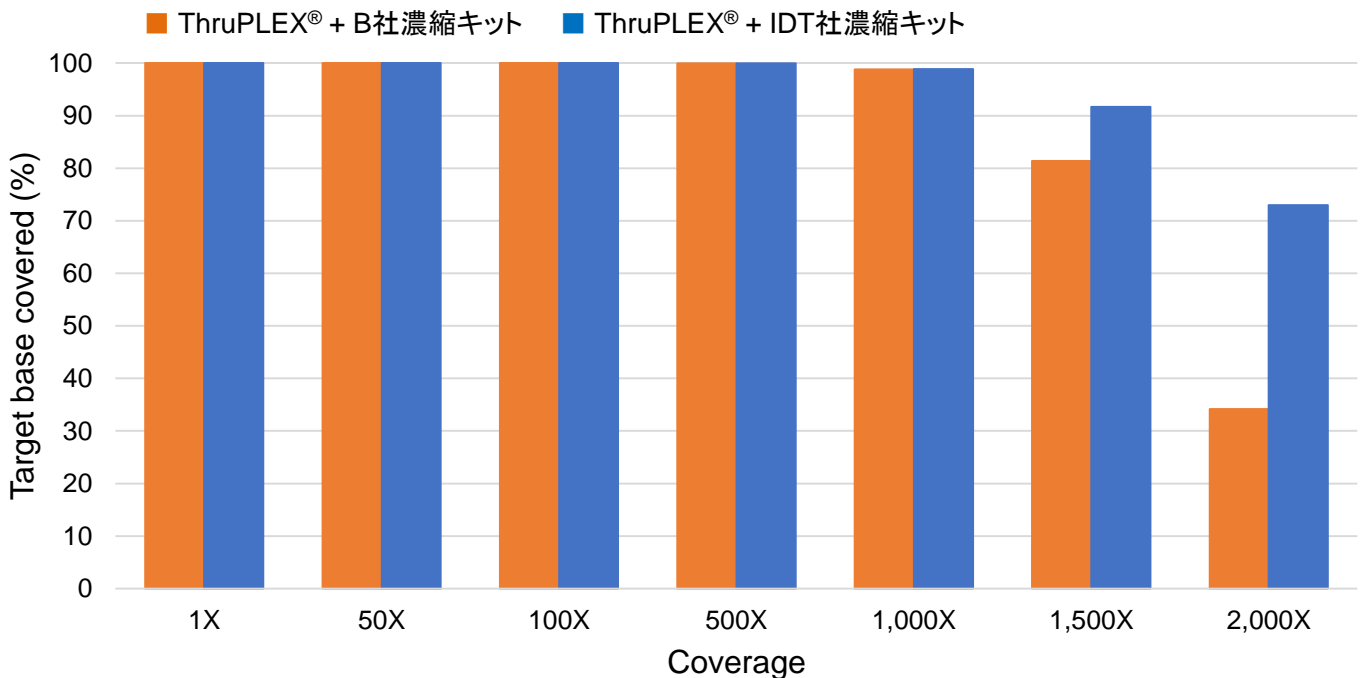
| ターゲット濃縮キット          | ThruPLEX + IDT社濃縮キット   |     |       |                        |     |       | ThruPLEX + B社濃縮キット     |     |       |                        |     |       |
|---------------------|------------------------|-----|-------|------------------------|-----|-------|------------------------|-----|-------|------------------------|-----|-------|
| 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             | 独自開発パイプライン             |     |       |                        |     |       | 独自開発パイプライン             |     |       |                        |     |       |
| Variant             | REF                    | ALT | AF    | REF                    | ALT | AF    | REF                    | ALT | AF    | 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、B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、B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

※B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® + B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。

# ThruPLEX®シリーズ 製品一覧

ピコグラムDNAに対応、最も汎用性の高いキット

## ThruPLEX® DNA-seq Kit

| インプットDNA量     | サンプル  | アプリケーション   |
|---------------|---|--|
| 50 pg ~ 50 ng | gDNA、FFPE DNA、<br>Cell-free DNA、<br>ChIP DNA<br>PCRアンプリコン | 全ゲノムシーケンス<br>全エクソームシーケンス<br>ターゲットシーケンス<br>ChIP-seq |

| 製品名                           | インデックス |      | 容量  | 製品コード   | 価格(税別)   |
|-------------------------------|--------|------|-----|---------|----------|
|                               | 種類     | タイプ  |     |         |          |
| ThruPLEX® DNA-seq 6S(12) Kit  | 6      | シングル | 12回 | R400523 | ¥93,000  |
| ThruPLEX® DNA-seq 12S(48) Kit | 12     | シングル | 48回 | R400428 | ¥322,000 |
| ThruPLEX® DNA-seq 48S Kit     | 48     | シングル | 48回 | R400427 | ¥322,000 |
| ThruPLEX® DNA-seq 48D Kit     | 48     | デュアル | 48回 | R400406 | ¥322,000 |
| ThruPLEX® DNA-seq 96D Kit     | 96     | デュアル | 96回 | R400407 | ¥548,000 |

1,600万種以上の分子タグで1分子を確実に解析

## ThruPLEX® Tag-seq Kit

| インプットDNA量 | サンプル   | アプリケーション                          |
|-----------|--|-----------------------------------|
| 1 ~ 50 ng | gDNA、FFPE DNA、<br>Cell-free DNA、<br>ChIP DNA | ターゲットシーケンス<br>ChIP-seq<br>ctDNA解析 |

| 製品名                          | インデックス |      | 容量  | 製品コード   | 価格(税別)   |
|------------------------------|--------|------|-----|---------|----------|
|                              | 種類     | タイプ  |     |         |          |
| ThruPLEX® Tag-seq 6S(12) Kit | 6      | シングル | 12回 | R400584 | ¥123,000 |
| ThruPLEX® Tag-seq 48S Kit    | 48     | シングル | 48回 | R400585 | ¥416,000 |
| ThruPLEX® Tag-seq 96D Kit    | 96     | デュアル | 96回 | R400586 | ¥718,000 |

### ■ お知らせ

上記製品のインデックスが別売りになった新パッケージ品を、2018年9月頃に発売する予定です。詳しくは弊社テクニカルサポートラインにお問い合わせいただくか、弊社ウェブサイトでご確認ください。

・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。・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。・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。・本パンフレット記載の価格は2018年8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。

2018年8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