

qPCR から AmpliSeq™ for Illumina Custom RNA Panel を用いた カスタム RNA-Seq への切換え

実践的な qPCR から次世代カスタム RNA シーケンスへの移行について

要点

- 効率的で、拡張性のあるワークフローによる時間とリソースの節約
- マルチプレックスによるハイスループット処理を実現
- ローカルまたはクラウドベースで選択できる使いやすいデータ解析
- シンプルで柔軟性のあるアライメントの品質管理
- サンプル間の倍率変化を、高い精度と感度で算出

はじめに

数十年もの間、逆転写定量 PCR (RT-qPCR) は遺伝子発現を定量する代表的な方法と考えられてきました^{1,2}。しかし、次世代シーケンス (NGS) の登場によって、RNA シーケンス (RNA-Seq) や、カスタムまたはターゲット RNA シーケンスなどのパワフルな新しい手法を用いた遺伝子発現解析が急激に増えています。

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、特異的遺伝子や対象領域にフォーカスしてカスタムでデザインできるパネルです。カスタム RNA パネルは多くの利点があります。qPCR およびサンガーシーケンスとは対照的に、カスタム RNA パネルは、千以上の遺伝子やターゲット領域の遺伝子発現プロファイルを同時に行うことができます³。

カスタム RNA パネルは非常に優れた利点をもたらしますが、多くの研究者は、qPCR とカスタム RNA パネル実験からの出力データをどのように比較すればよいかわからなかったり、カスタム RNA パネルのデータ解析の開始方法について不確かだったりする場合があります。本アプリケーションノートでは qPCR とカスタム RNA シーケンスとの類似性と相違について、実験デザイン、ワークフロー、品質管理方法、およびデータ解析の要素を比較して説明します。

実験デザイン

qPCR およびカスタム RNA パネルともに 生物学的レプリケートが必要

遺伝子発現研究では、生物学的レプリケートは異なる生物学的サンプルからなり、それらは qPCR またはシーケンス工程を別々に行って処理したものです (例、*P. aeruginosa* の 2 株培養を別々に増殖し、別々にシーケンスします)。ほとんどの発現差異の実験では、生物学的不一致があり、生物学的レプリケートが必要と

なります。一般的に、生物学的レプリケートの数を増やすことによって、検出力を増加させ、差次的に発現した遺伝子を検出し、それによって誤検出率も減少させます⁴。しかし、特定の試験に必要なとされる生物学的レプリケートの正確な数を特定することは実験の目的に応じて変化し、現在進行中の研究の的となっています。1 つまたは 2 つ以上の要素で発現量が変化する一部の遺伝子を同定することが主な目的である場合、条件ごとに 3 つのレプリケートで十分な場合があります⁴。しかし研究の目的が、低発現量の遺伝子を含む差次的に発現した大半の遺伝子のプロファイリングである場合、条件ごとに少なくとも 10~12 の混ざり気のないレプリケートを使用することが一部の専門家によって推奨されています^{5,6}。

遺伝子発現研究デザインにおける詳細なガイダンスについては、Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE: 定量的リアルタイム PCR 実験の公表に必要な最低限の情報) コンソーシアムが RT-PCR 実験を評価するためのガイドラインを作成しており⁷、ENCODE コンソーシアムは RNA-Seq 研究デザインのためのガイドラインを作成しています⁸。研究目標が何であれ、初めに予備的試験を実施してアッセイ固有の変動および観測可能な生物学的影響の潜在的なサイズを評価し、生物学的レプリケートの必要な数を推測することが推奨されています。

定量的 PCR は技術的レプリケートが必要、 カスタム RNA パネルは不要

技術的レプリケートとは、生物学的 RNA サンプルが同じであるレプリケートですが、遺伝子発現を測定するために用いる技術的なステップは別々に行います (例、各サンプルについてトリプレケートで実施する qPCR 反応)。技術的レプリケートは、ピペッティングエラーや酵素効率のわずかな差などのアッセイにおける測定エラー量を減らします。qPCR とは対照的に、AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel などの次世代 RNA シーケンス法は、反復した測定間で高い一致を示し³、生物学的な変動が異常に高い場合を除いて、技術的レプリケートは必要ありません^{7,8}。

カスタム RNA パネルはカバレッジレベルの特定が必要

必要なカバレッジ深度は、すべてのシーケンス実験で特定しておく必要がある重要なパラメーターです。



カバレッジレベル: シーケンスカバレッジとは、既知のリファレンス塩基にアライメントした、またはカバーしたリードの平均数のことを指します。例えば、100x カバレッジでシーケンスした遺伝子とは、平均でその遺伝子の各塩基が 100 回シーケンスされたことを意味します。

研究者は、研究のタイプ、リファレンスゲノムのサイズ、公表された文献、および科学コミュニティによって規定されているベストプラクティスに基づいて、必要なカバレッジレベルを特定します。例えば、多くの科学論文誌では、全ゲノムシーケンスを用いてヒトのバリエーション同定を行うためには、アプリケーションおよび統計学的モデルに応じて、10x ~30xのカバレッジ深度を必要としています。RNA シーケンスについては、カバレッジの特定はさまざまな転写産物がさまざまなレベルで発現しているため複雑になります。これは、発現の高い遺伝子から捉えられたリードはより多くなり、発現の低い遺伝子から捉えられたリードはより少なくなることを意味します。まれにしか発現しない遺伝子を検出するには、カバレッジレベルを増やさなければならない場合があります。

これらのリソースは、特定のアプリケーションに対するカバレッジの要求事項を検索するのに適しています。

- [Illumina Coverage Depth Recommendations](#)
(イルミナのカバレッジ深度推奨) ページ
- [Considerations for RNA-Seq Read Length and Coverage](#)
(RNA-Seq のリード長およびカバレッジの検討) テクニカルサポート掲示板

ワークフロー

qPCR とカスタム RNA パネルのワークフローの比較

qPCR と AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel のワークフローの大きな違いは、1 ランで作成されるデータ量です。500 ターゲットおよび 48 サンプルと仮定すると、qPCR は 16 日間 63 回の反復ランが必要ですが、カスタム RNA パネルなら同じデータを収集するために、1 つのパネルで 2 日間のランで済みます。(図 1)。そのため、qPCR とカスタム RNA パネルのどちらかを選択する場合、対象遺伝子 (ターゲット領域) の合計数とその試験に必要なサンプル数を考慮することが重要です。qPCR は遺伝子数が少ない (1~20 ターゲット領域) 場合に適した選択となります。一方で、AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、1 回のアッセイで 12~1200 遺伝子またはターゲット領域の発現を測定することができます。さらに、ハイスループットが必要な場合には、装置のシーケンス性能に応じて異なります

が、カスタム RNA パネルは、ランあたり最大 384 サンプルをマルチプレックス (複数を同時に) で解析することができます³。qPCR の場合、RNA サンプルは個別に、反復したプロセスを用いて分析する必要があります。



マルチプレックス: NGS におけるライブラリーのマルチプレックスとは、多くのライブラリー (サンプル) を一緒にプールし、同時にシーケンスすることができるプロセスです。マルチプレックスはパワフルな方法であり、ラン時間またはコストを増やすことなく、1 回のランで解析するサンプル数を増やします。

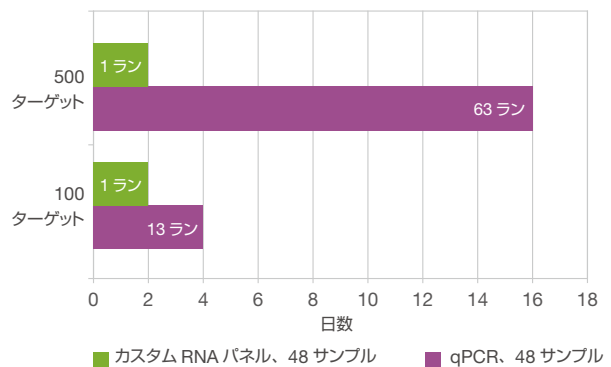


図 1: qPCR と AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel のワークフローの比較 アッセイごとのターゲットマルチプレックスおよびランごとのサンプルマルチプレックスが可能のため、カスタム RNA パネルは全体のワークフローに要する時間を劇的に短縮します。

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel のデザインからデータ取得までのワークフロー

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、オンラインでのパネルデザイン、迅速なライブラリー調製、およびユーザーフレンドリーなデータ解析を含めた統合されたソリューションの一部です (図 2)。カスタム RNA パネルは、わずか 1 ng のトータル RNA から開始でき、インデックスが付加され、シーケンスにすぐに使用できる、ターゲット特異的遺伝子または対象領域のライブラリーを生成します。すべてのターゲットは 1 回の反応で増幅され、qPCR などの方法と比較して、潜在的なバイアスを最小限にし、ワークフローステップを削減します。ライブラリー調製からデータ解析まで 2 日以内で行います³。

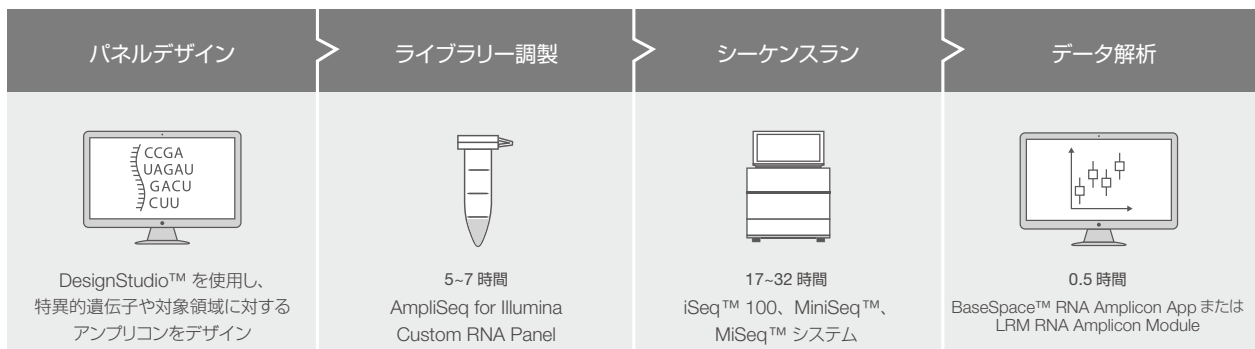
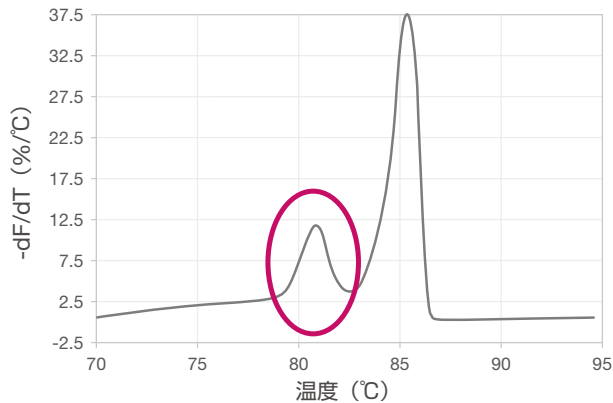


図 2: AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel のデザインからデータ取得までのワークフロー AmpliSeq Custom RNA Panel ワークフローにはプライマーデザインから最終的なデータ解析までの統合されたステップが含まれます。

A. PCR QC : 融解曲線



B. RNA-Seq QC : リードアライメント



図 3 : qPCR およびカスタム RNA パネルの品質管理方法の比較 (A) qPCR の品質管理は融解曲線を使って実施します。この例では、小さい 2 つ目のピークは予想外の PCR 産物を示しています。(B) カスタム RNA パネルの品質管理はシーケンスアライメントを利用し、これにより予想外のシーケンスをフィルターで除去します。

品質管理

qPCR およびカスタム RNA パネルの品質管理方法の比較

qPCR およびカスタム RNA パネルのいずれの方法も品質管理ステップがあり、アッセイの完全性を保証します。qPCR による遺伝子発現解析の場合、融解曲線解析によりアッセイの特異性(すなわち、単一産物または複数産物が増幅されたかどうか)を確認します(図 3)。qPCR では、融解曲線における予想外のピークが存在は、コンタミネーションまたは非特異的プライマーデザインを示します。多くの場合、複数のピークが観測された時はその実験は反復する必要がある、または新しいプライマーをデザインする必要があります。

カスタム RNA パネルの場合、アッセイの特異性はその配列自体を用いて確認するため、いくつかの重要な利点があります。すべての NGS 法で行われるように、コンタミネーションしている配列はリファレンス配列にアライメントしないため、データセットからフィルターをかけられます。

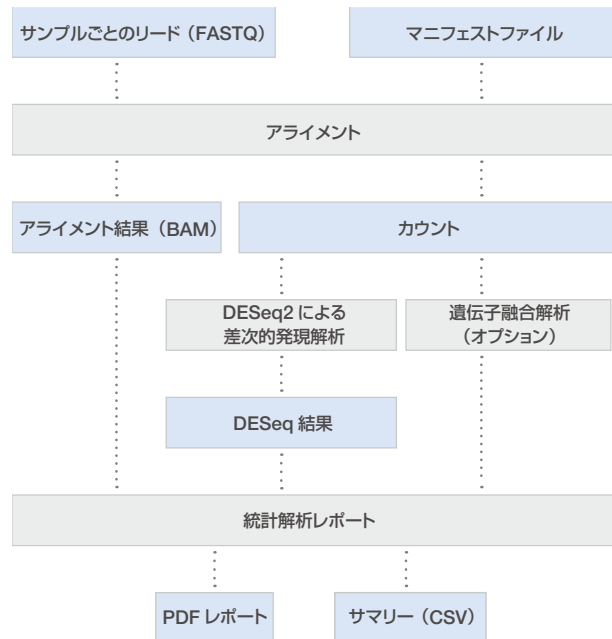


図 4 : RNA Amplicon App による倍率変化の算出 RNA Amplicon App により、NGS アンプリコンパネルの合理化された遺伝子発現解析が可能になります。アライメントは Burrows Wheeler Aligner を用いて実施します。差次的発現解析は DESeq2 を用いて実施しています。このアプリケーションはカスタムのマニフェストファイルをインポートすることで、カスタムアンプリコンパネル解析をサポートします。

データ解析

RNA Amplicon App を用いたユーザーフレンドリーなデータ解析

AmpliSeq for Illumina Custom RNA のデータ解析には、高度な訓練を受けたバイオインフォマティクスのサポート、または専門の高性能なコンピューティングインフラストラクチャーは必要ありません。生シーケンスデータがシーケンサーシステムから、クラウドベースのイルミナゲノムコンピューティングプラットフォームである BaseSpace™ Sequence Hub に直接ストリームされます。リードのアライメントおよび発現プロファイリングを含む二次解析は、BaseSpace にある RNA Amplicon App で行うことができます⁹。このアプリケーションは、マニフェストファイル(配列領域を指定したポジションファイル)に、指定された領域に対してリードを並べ、さまざまなサンプル間の相対的な転写産物の発現を定量化し、サンプル間の存在量を比較します(図 4)。

同じ二次解析ワークフローは、Local Run Manager にある RNA Amplicon Module で実施することもできます。Local Run Manager はランの作成、状況のモニタリング、シーケンスデータの解析を行うために使用するオンサイトのソフトウェアプラットフォームです。Local Run Manager は、シーケンサーシステム(iSeq™、MiniSeq™、MiSeq™、NextSeq™ システム)に内蔵された on-instrument 版、および別のコンピューターにインストールして利用する off-instrument 版の両方を利用することが可能です。

	qPCR	カスタム RNA パネル
生データの取得	<ul style="list-style-type: none"> リファレンス遺伝子の Ct 値を計算 対象遺伝子の Ct 値を計算 	<ul style="list-style-type: none"> リードアライメントを実施 (サンプル) リードアライメントを実施 (コントロール)
データ処理	<ul style="list-style-type: none"> Δ Ct を計算 (サンプル) Δ Ct を計算 (コントロール) 	<ul style="list-style-type: none"> 生リードカウントを計算 (サンプル) 生リードカウントを計算 (コントロール)
ノーマライゼーション	<ul style="list-style-type: none"> $\Delta\Delta$ Ct を計算 (サンプル) 	<ul style="list-style-type: none"> DESeq2 で遺伝子およびカバレッジベースのノーマライゼーションを実施 (サンプル)
倍率変化を計算	<ul style="list-style-type: none"> $2^{\Delta\Delta}$ Ct 値を計算 (サンプル) 	<ul style="list-style-type: none"> DESeq2 で log2 変化比を計算 (サンプル)
視覚化	<ul style="list-style-type: none"> 棒グラフ、散布図、線グラフ、表 	

図 5: qPCR 対カスタム RNA パネルの倍率変化の算出 データの解析方法は異なりますが、qPCR と RNA-Seq 実験との発現レベルの倍率変化を比較することが可能です。

qPCR およびカスタム RNA パネルスキャンのいずれも発現データの倍率変化を提供

qPCR 遺伝子発現研究のデータ解析は、一般的にサイクル閾値 (Ct)、内在性リファレンス遺伝子へのノーマライゼーション、および発現レベルの倍率変化です¹⁰。ターゲット化した RNA-Seq 遺伝子発現研究は、異なるノーマライゼーション因子である、遺伝子の長さやシーケンス深度を考慮する必要があります。遺伝子の長さは、長い遺伝子産物ほどマップされるリードの数が多くなるため、重要になります。シーケンス深度も転写産物あたりのリード数に影響を及ぼします。RNA Amplicon App は遺伝子およびカバレッジベースのノーマライゼーションを行い、DESeq2 を用いてノーマライゼーションしたリード数を計算します⁵。Ct 値は直接リード数に換算することはできませんが、倍率変化の値を計算して、qPCR およびカスタム RNA パネルデータ間を直接比較できます (図 5)。

製品情報

製品	カタログ番号
AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel	20020496
AmpliSeq for Illumina ERCC RNA Spike-In Mix	20030697
AmpliSeq for Illumina ERCC Companion Panel	20030696
AmpliSeq for Illumina CD Indexes Set A-D	20031676

詳細はこちらから

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel の詳細については、www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-rna-panel.html をご覧ください。

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. 470-2019-003-A-JPN 20SEP2019

illumina[®]

参考文献

- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25: 169-93.
- Ho-Pun-Cheung A, Cellier D, Lopez-Crapez E. Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology. *Ann Biol Clin(Paris)*. 2008; 66: 121-9.
- Illumina(2019). *AmpliSeq for Illumina Custom RNA Sequencing Panel Data Sheet*. Accessed April 16 2019.
- Schurch NJ, Schofield P, Gierliński M, et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2016; 22: 839–851.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15: 550.
- Busby MA, Stewart C, Miller CA, Grzeda KR, Marth GT. Scotty: a web tool for designing RNA-Seq experiments to measure differential gene expression. *Bioinformatics*. 2013; 29: 656-7.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55: 611-22.
- The ENCODE Consortium. Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq. Jan 2017. Accessed May 5 2019.
- Illumina. *RNA Amplicon App*. Accessed April 26 2019.
- Kang XP, Jiang T, Li YQ, et al. A duplex real-time RT-PCR assay for detecting H5N1 avian influenza virus and pandemic H1N1 influenza virus. *Viral J*. 2010; 7: 113.