

Library Preparation workflow using automation system of Biomek NX^P

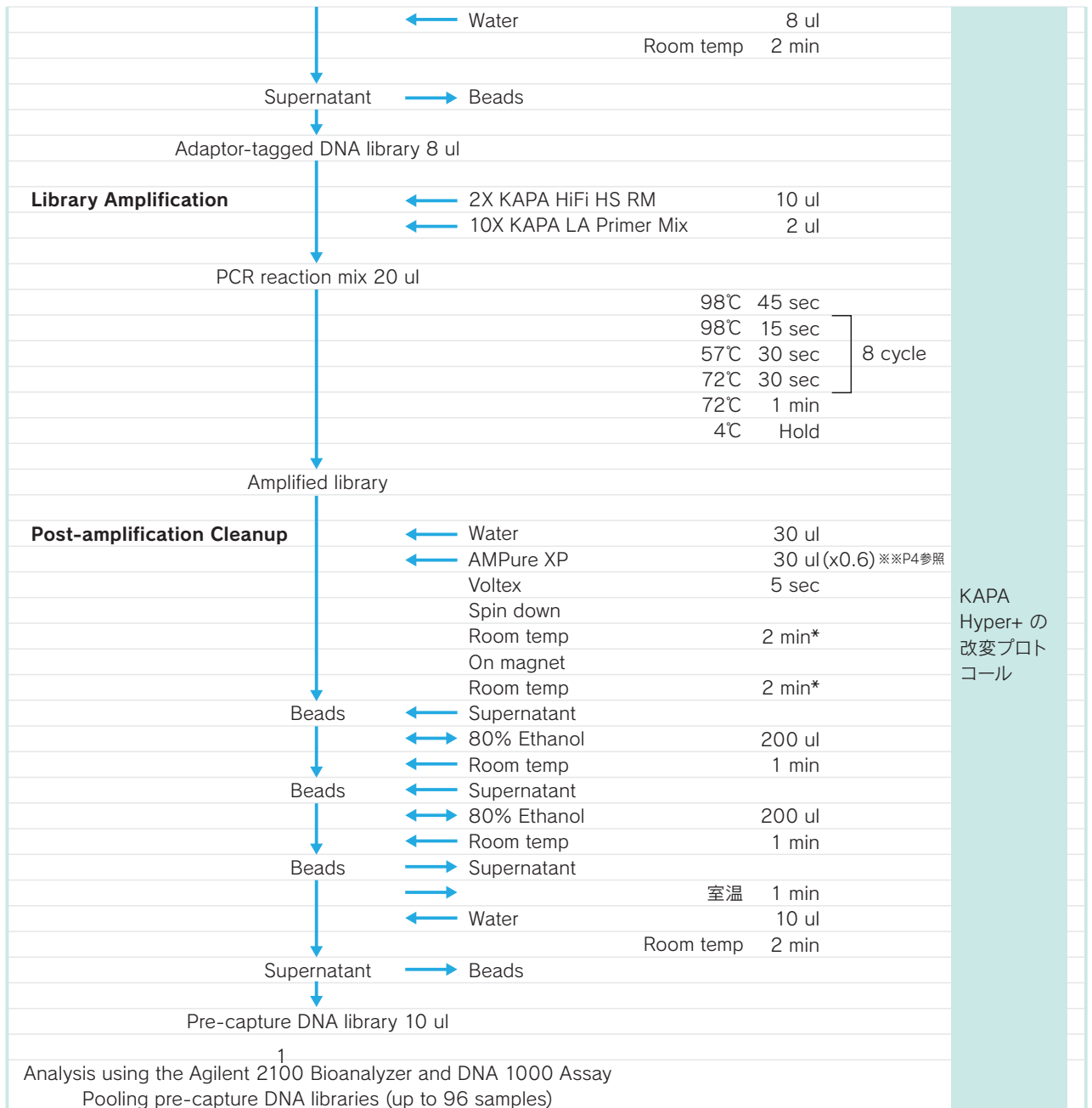
automation

KAPA HyperPlus Kit中の断片化酵素(KAPA Frag Enzyme)は、EDTAの影響を受ける。
 サンプルがEDTAを含む溶液の場合は、サンプル中のEDTAを完全に除去するために、下記のAMPure精製を行う。

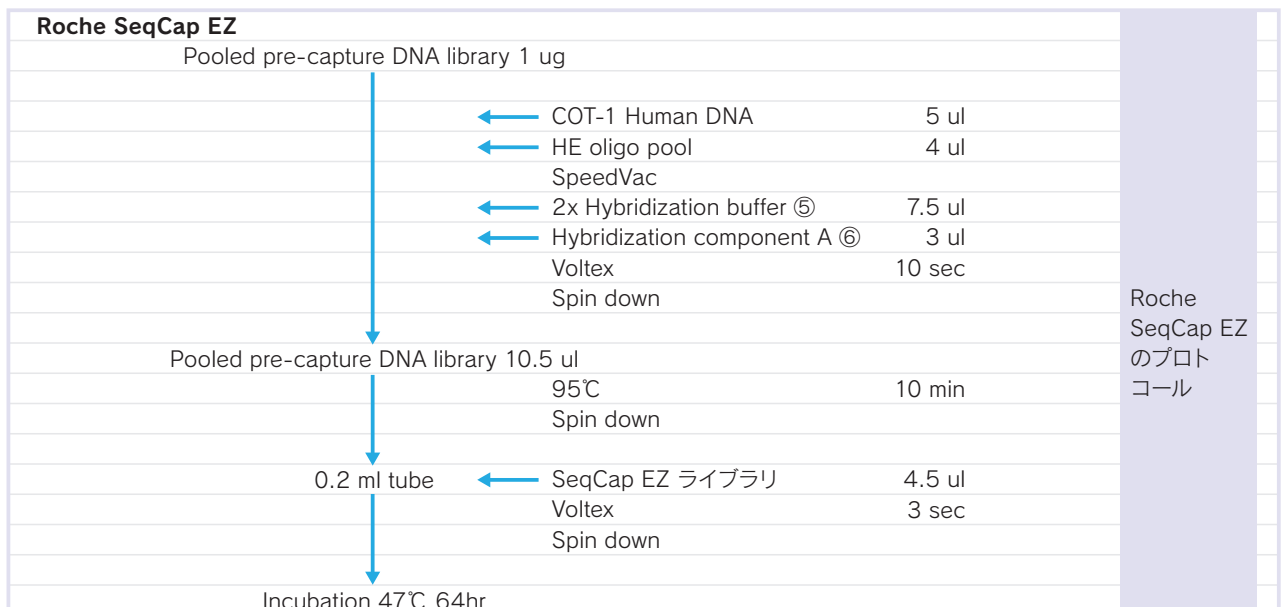
	DNA (200ng)	X ul			
Post-ligation Cleanup	←	Water	10-X ul		
	←	AMPure XP	10 ul		
		Vortex	5 sec		
		Spin down			
		Room temp	2 min		
		On magnet			
		Room temp	2 min		
		←	Supernatant		
		→	80% Ethanol	200 ul	
			Room temp	1 min	
	←	Supernatant			
			37°C	1 min	
	←	Water	7 ul		
		Room temp	2 min		
	→	Beads			
	Supernatant				
	DNA 7 ul				
Enzymatic Fragmentation	←	KAPA Frag Buffer	1 ul] Mix	
	←	KAPA Frag Enzyme	2 ul		
		Vortex			
		Spin down			
		On ice			
			4°C	1 min	
			37°C	5 min ※P4参照	
			4°C	Hold	
			On ice		
	End Repair and A-tailing	←	End Repair & A-Tailing Buffer	1.4 ul] Mix
←		End Repair & A-Tailing Enzyme	0.6 ul		
		Vortex			
		Spin down			
		On ice			
		65°C	30 min		
		4°C	Hold		
Adapter Ligation		Adapter stock 5-fold dilution	2 ul		
		Vortex			
		Spin down			
		Ligation Buffer	6 ul] Mix	
		DNA Ligase	2 ul		
		20°C	15 min		
	Adapter ligation reaction product		22 ul		
Post-ligation Cleanup	←	AMPure XP	17.6 ul		
		Vortex	5 sec		
		Spin down			
		Room temp	2 min*		
		On magnet			
		Room temp	2 min*		
		→	Supernatant		
		←	80% Ethanol	200 ul	
			Room temp	1 min	
		→	Supernatant		
	←	80% Ethanol	200 ul		
		Room temp	1 min		
	→	Supernatant			
			37°C	1 min	

AMPure
 精製の
 オプション

KAPA
 Hyper+ の
 改変プロト
 コール



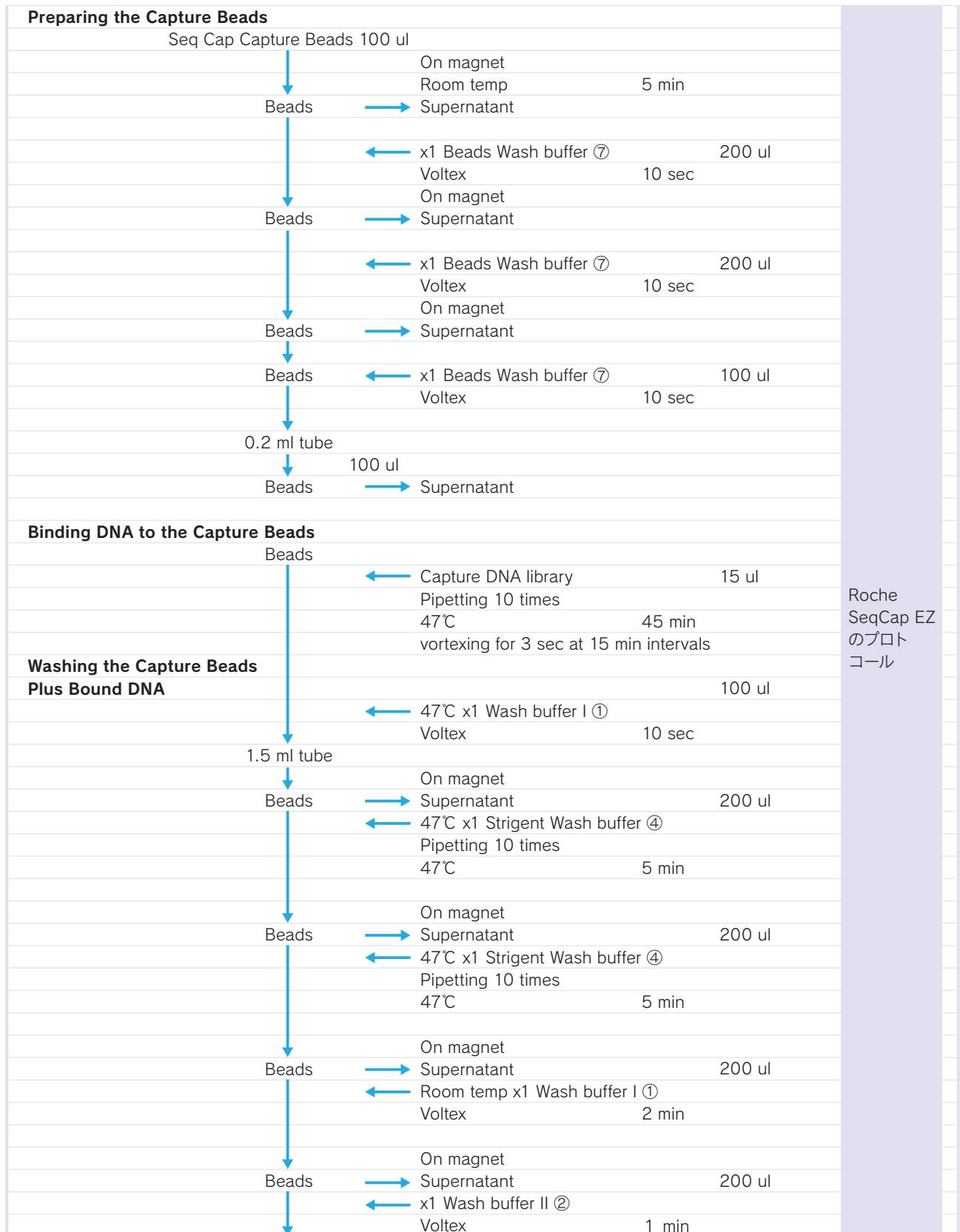
manual

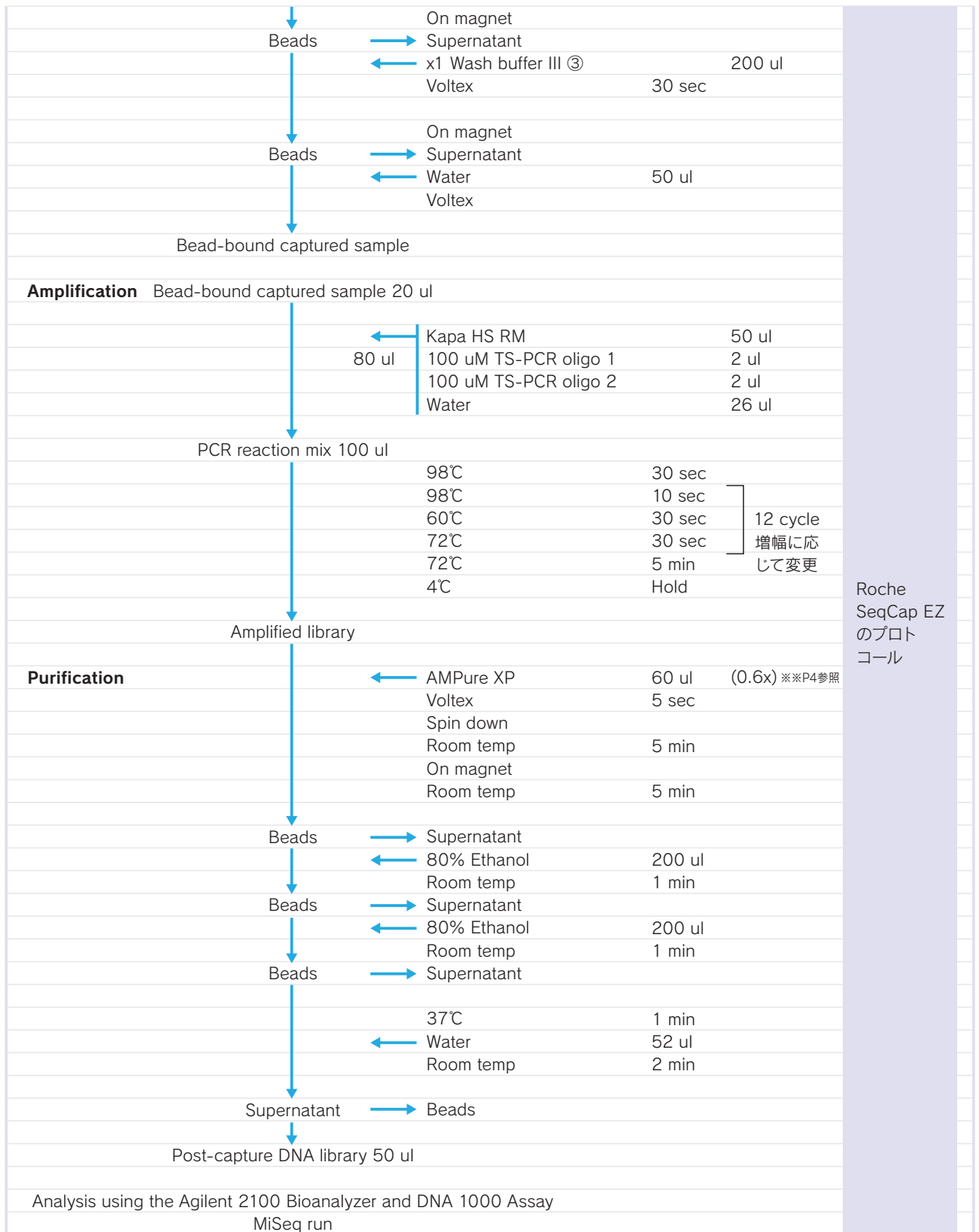


SeqCap EZ

Preparing Sequence Capture and Bead Wash Buffers

SeqCap Hybridization and Wash Kit	Reagent/1prep	PCR grade water/1prep	使用温度
10x Wash buffer I ①	10 ul	90 ul	47°C
10x Wash buffer I ①	20 ul	180 ul	Room temp
10x Wash buffer II ②	20 ul	180 ul	Room temp
10x Wash buffer III ③	20 ul	180 ul	Room temp
10x Strigent Wash buffer ④	40 ul	360 ul	47°C
2.5x Beads Wash buffer ⑦	200 ul	300 ul	Room temp








※ target size 600bp

※※ target size 600bpであり、300bp以下を選択するため、この濃度で使用(BeNUS (Beads-based Normalization for Uniform Sequencing)法) 詳しいプロトコルに関しては、日本ジェネティクス社アプリケーションノートApplication Note 2014 (01) を参照

Newly designed adapters for KAPA HyperPlus kit

Adapter ligationの概略図

Universal Ad1 :	5'   3' 5' [PHO]GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC
Universal Ad2 :	5'  3' 5' ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T

● Reaction step

- ユニバーサルアダプターAd1, Ad2を各30uMを等量混合する。
希釈Buffer: Annealing Buffer(シグマ)
- 上記の1)で混合したアダプターをY字構造にするために、下記の温度ステップを実施し、分注ストックする。
ヒートブロック95°C,5min → ヒートブロックの電源を切って、室温になるまで放置
注意: Y字構造にしたアダプターは、Y字構造の維持のため、温度管理に注意してください。

3) Adapter ligation反応により、Y字にしたUniversal primerを付加する

Adapter (10 μM)	2μl	20°C	15min
Ligation Buffer	6μl		
DNA Ligase	2μl		
total	10μl		

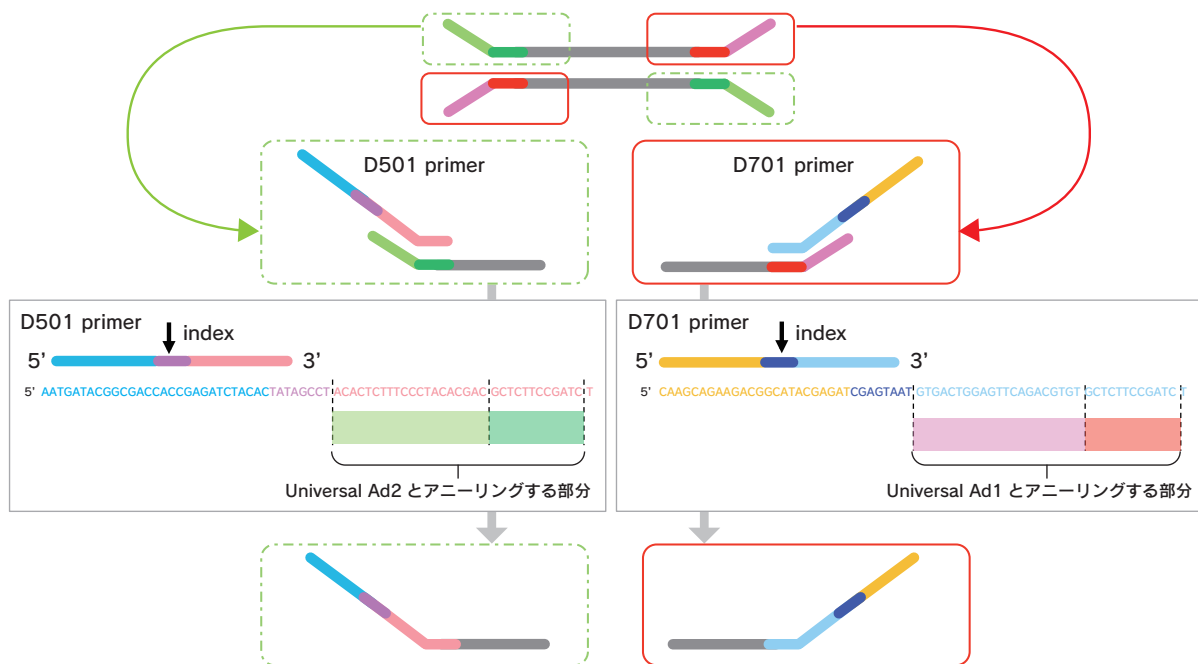


4) AMPure XPで精製する

5) Library Amplification反応
(ここでインデックスプライマーを付加)

ライブラリー	8μl	98°C	45sec	} 8cycles
2X KAPA HiFi HSRM	10μl	98°C	15sec	
D501 Primer Mix (100μM)	1μl	57°C	30sec	
D701 Primer Mix (100μM)	1μl	72°C	30sec	
total	10μl	72°C	1min	
		4°C	∞	

※ PCRサイクル数は条件によって10サイクルまで増やした



6) 下記のようなindexが付いた構造が形成される



7) AMPureXPで精製する

Materials

以下の情報にて、オリゴ合成会社（ユーロフィンジェノミクス株式会社）に発注

No	Name	Sequence(5' to 3')	OD	nmol	base	MW	Tm1	Tm2	Purif.	μM
1	Universal Ad 1	[PHO]GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC	5.5	15.0	33	10197	67	-	OPC	Dry
2	Universal Ad 2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T	6.4	20.0	33	9911	66	-	OPC	Dry
3	D501 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCC TACTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	70	21269	73	77	OPC	Dry
4	D502 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGA GGCACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.2	7.0	70	21343	74	78	OPC	Dry
5	D503 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTAT CCTACTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.0	7.0	70	21205	74	77	OPC	Dry
6	D504 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCT GAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	70	21310	74	78	OPC	Dry
7	D505 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCG AAGACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.2	7.0	70	21368	74	78	OPC	Dry
8	D506 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCT TAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	70	21268	72	76	OPC	Dry
9	D507 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGA CGTACTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.2	7.0	70	21319	74	77	OPC	Dry
10	D508 primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	70	21294	74	77	OPC	Dry
11	D701 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.2	7.0	66	20442	73	77	OPC	Dry
12	D702 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.0	7.0	66	20394	74	78	OPC	Dry
13	D703 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.2	7.0	66	20467	73	78	OPC	Dry
14	D704 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20418	73	78	OPC	Dry
15	D705 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAATGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20408	72	77	OPC	Dry
16	D706 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20402	73	77	OPC	Dry
17	D707 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20418	73	78	OPC	Dry
18	D708 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATAGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20418	73	78	OPC	Dry
19	D709 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20403	84	78	OPC	Dry
20	D710 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCGCGGAGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20434	74	78	OPC	Dry
21	D711 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.1	7.0	66	20468	75	80	OPC	Dry
22	D712 primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGCTGTG ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	5.0	7.0	66	20369	73	78	OPC	Dry

キャプチャーのときに使用する Hybridization Enhanced Oligo

HE D50X oligo	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACNNNNNNNNACA CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT[AmC7]	5.1	7.0	70	21503	74	-	OPC	Dry
HE D70X oligo	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNNNGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT[AmC7]	5.1	7.0	66	20627	73	-	OPC	Dry

KAPA HyperPlus Kit

Cat.No. KK8510 KAPA HyperPlus Kit / 8 回用
 Cat.No. KK8512 KAPA HyperPlus Kit / 24 回用
 Cat.No. KK8514 KAPA HyperPlus Kit / 96 回用

Roche SeqCap EZ Choice Library

Cat.No. 06266282001

Agencourt Ampure XP

Agencourt AMPure XP 60 mL Kit A63881

Beckman Coulter Agencourt Genfind v2 kit

Cat.No. A41499 50 サンプル分
 Cat.No. A41497 384 サンプル分

Bioanalyzer DNA1000 and High-sensitivity kit