



Application

微量なdsDNA (10-1,000pg) を用いたKAPA Hyper Prep Kit ライブラリー調製プロトコルの最適化 (LIMprep2[※])

製品名

KAPA Hyper Prep Kit (KK8500, KK8502, KK8504)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

はじめに

KAPA Hyper Prep Kitは1ngまでのdsDNA (1ng ~ 1μg) からのライブラリー調製に適したキットですが、今回は、更に微量な (10-1,000pg) に対応できるようにプロトコルの最適化を実施し、運用している事例 (LIMprep2) をご紹介いたします。

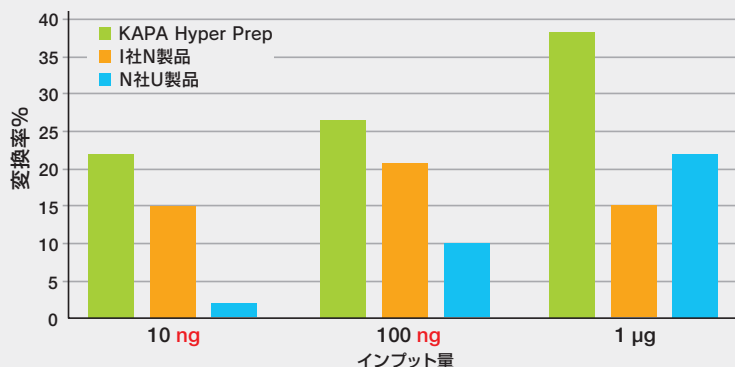
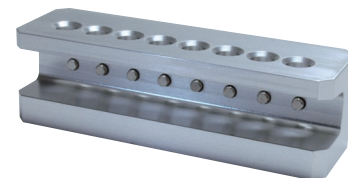
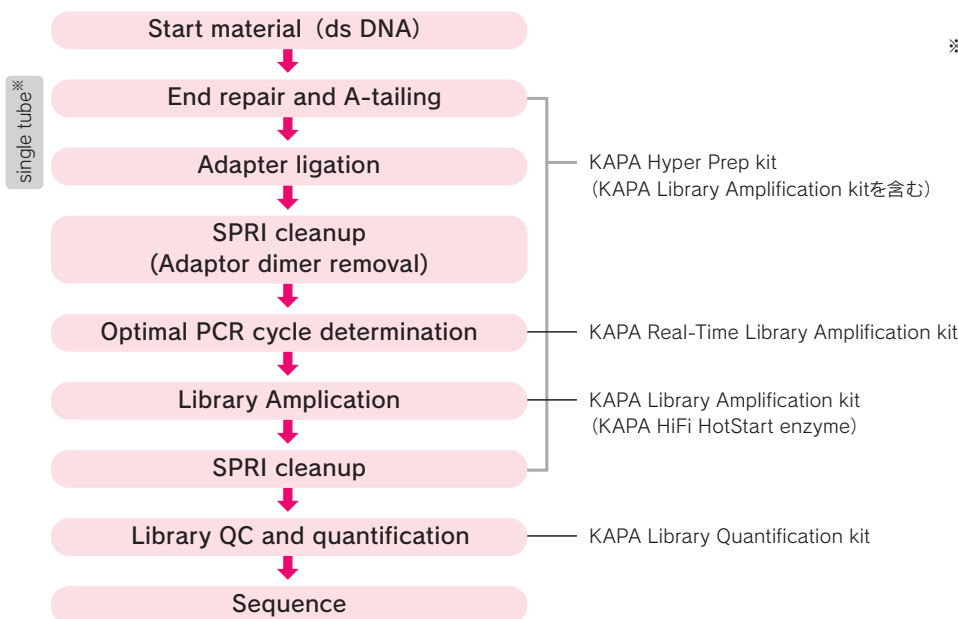


図1 インプットDNAに対するライブラリーへの変換効率

KAPA Hyper Prep KitではインプットDNAを、より多くのアダプター付加済みライブラリーに変換させます。コバリスで断片化されたDNAから作成されたライブラリーは、アダプター・ライゲーション後にKAPA Library Quantification Kitにより定量されました (左図参照)。KAPA Hyper Prep KitはDNAインプット量 (10ng, 100ng, 1μg) に関わらず、最も高いアダプター付加済みライブラリーへの変換率を示し、より少ないサイクル数での増幅で1μgのライブラリーを作製することが出来ました。
(KAPA Biosystems社データ)

以下のアプリケーションデータは理化学研究所情報基盤センター バイオインフォマティクス研究開発ユニット 笹川洋平 様のご厚意により掲載させていただきました。

LIMprep2 Workflow



磁気ビーズによる精製ステップには、微量サンプル用マグネットスタンド MagnaStand YS-Model (8連×0.2ml PCRチューブ用 Cat#FG-SSMAG2) を使用

※ Quartz-Seq (シングルセルRNA/微量RNAからのRNA-Seq) 全般に関する詳細プロトコル (LIMprep2プロトコル含む) は、下記の理化学研究所 情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニットのプロトコルページよりダウンロードいただけます。
<http://bit.accc.riken.jp/protocols/>

結果

事例データ①

1ng fragmented 200bp genomic DNAを用い、アダプター濃度の最適化を実施した。

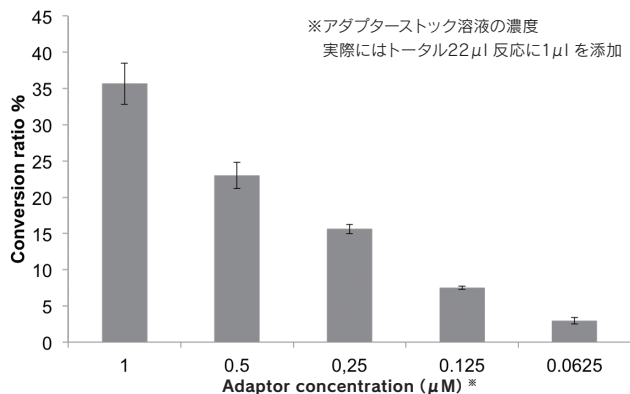


図2 アダプター濃度とライブラリー転換効率の検証

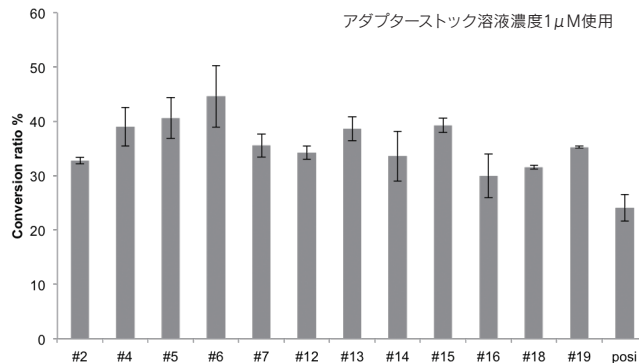
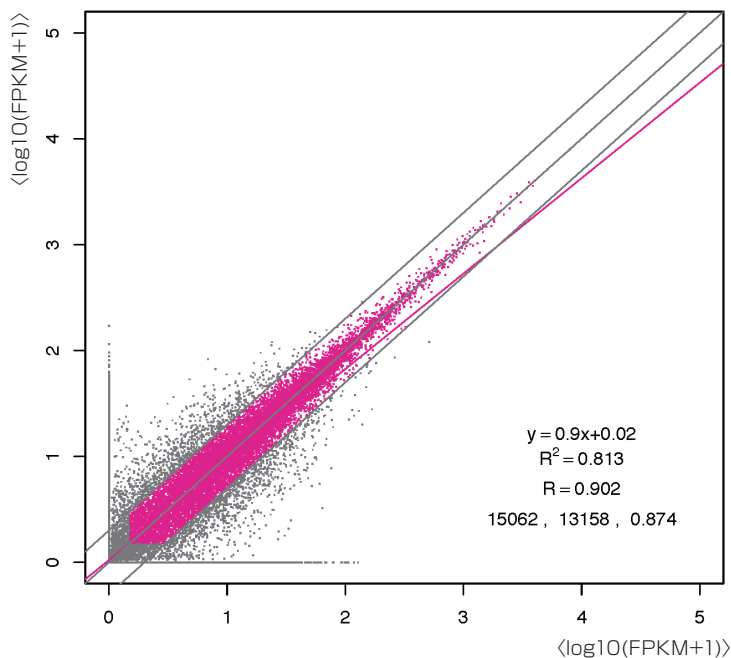


図3 使用したindexの異なるアダプター間の比較

事例データ②

Quartz-seq*のcDNAからテクニカルレプリケートとして、LIMprep2プロトコルを用いて複数回ライブラリーを作製し、MiSeqでシーケンスした。その結果、概ね1-2M readsのデータを得られ、少ないリードでも高い相関性を示し、Quartz cDNAから高い精度でシーケンスが実施可能であることを確認した。

発現定量し、散布図で確認した。



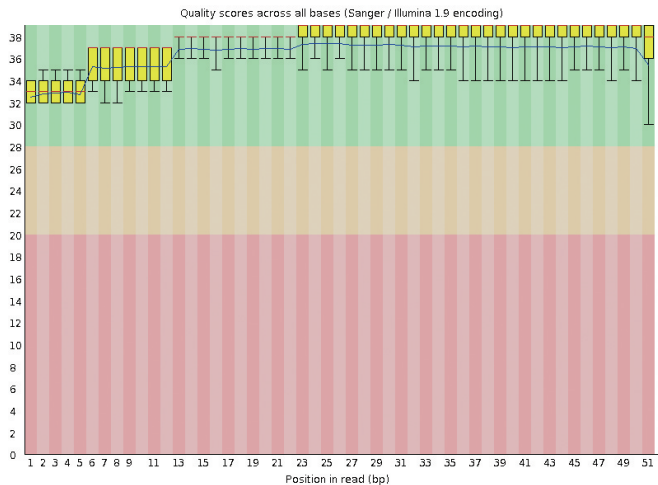
少ないリード数でも十分な相関が得られている

* Quartz-Seq (シングルセルRNA/微量RNAからのRNA-Seq) 全般に関する詳細プロトコル (LIMprep2プロトコル含む) は、下記の理化学研究所 情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニットのプロトコルページよりダウンロードいただけます。
<http://bit.accc.riken.jp/protocols/>



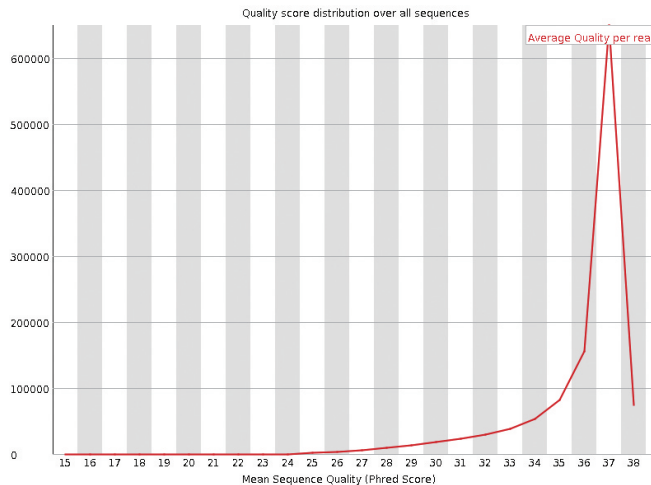
Adaptorを除いて、FASTQCを実施した結果データ

Per base sequence quality



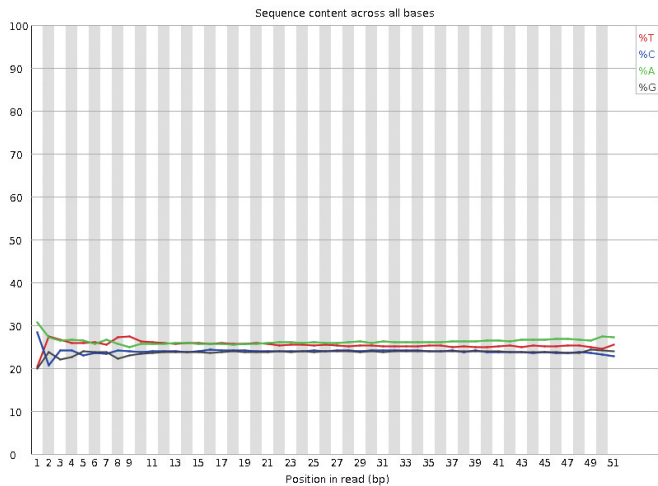
リード50bpでも高いクオリティを維持

Per sequence quality scores



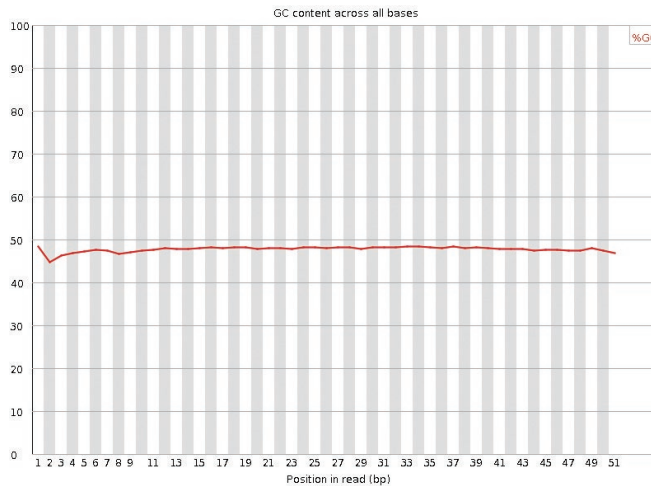
クオリティスコアは37が多い

Per base sequence content



読み初めから塩基に偏りが無い

Per base GC content

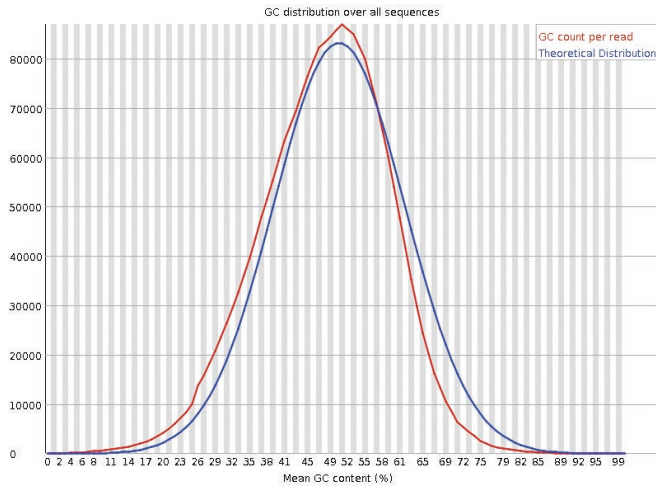


50bpまでGC含有率も偏りが無い



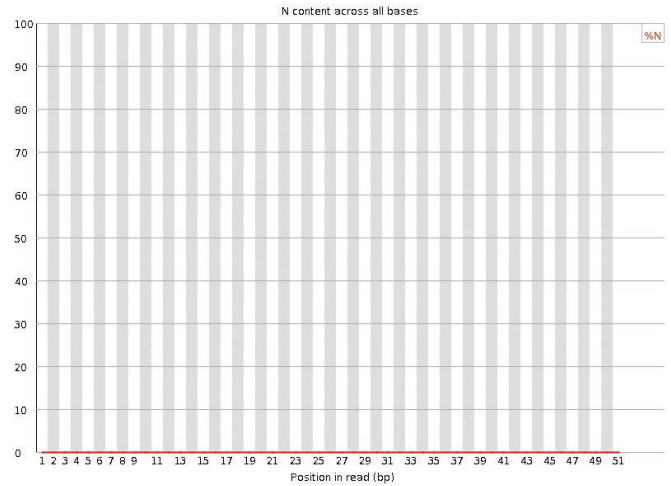
Adaptorを除いて、FASTQCを実施した結果データ

Per sequence GC content



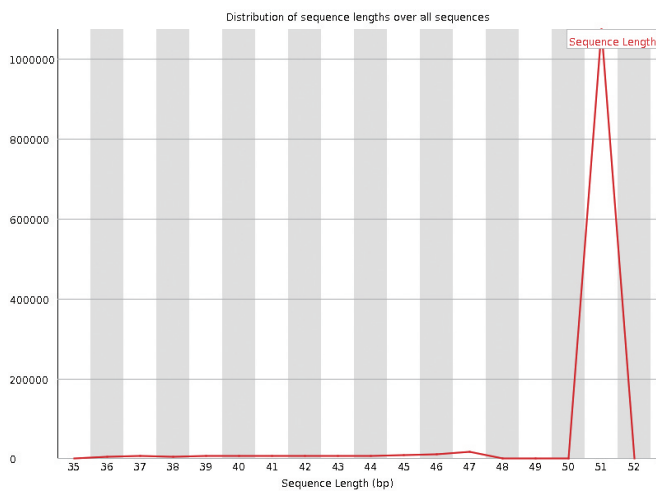
理論値と同様のリードGC含有率の正規分布

Per base N content



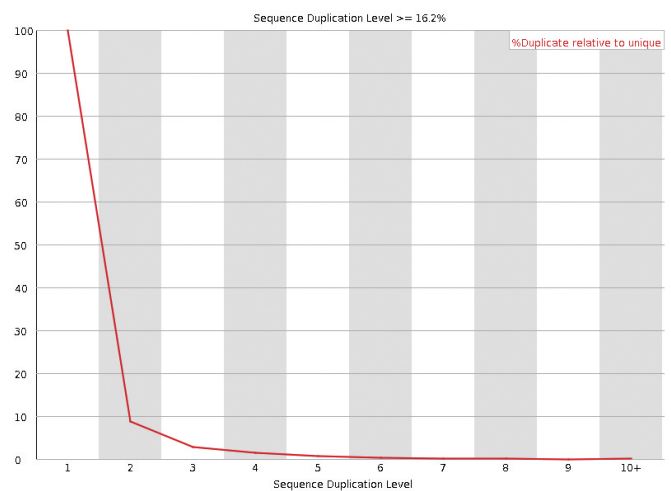
Nは現れなかった

Sequence Length Distribution



リード長は51bpとなった

Sequence Duplication



重複リードはほとんどなかった



お客様のコメント

KAPA社の前キットも酵素の安定性など優れた点が多かったですが、精製工程が多く、one-tubeで反応が完了するキットが一部他の会社から売りだされるなど、もっと単純化されることが望まれていました。KAPA Hyper Prep kitは、工程の単純化と精度の担保と向上を同時に達成した良いキットだと思います。KAPA社は、安全マージンを多めにとってプロトコルを出しているため、1ng以下の微量におけるデータがありませんでしたが、我々が確かめたところ微量領域においても高いライブラリー変換効率を保つことが確かめられました。最適化プロトコルは我々のラボWebサイトからダウンロードできます。少ない工程で、液を上から足していけば達成できるので、大多数のユーザーにとってファーストチョイスになると思いました。