



Application

PMS2遺伝子 (遺伝性大腸がん原因遺伝子のひとつ) を標的とした ATリッチ領域を含む長鎖アンプリコンの効果的なシーケンス

製品名

KAPA Library Amplification Kit (KK2611, KK2612)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

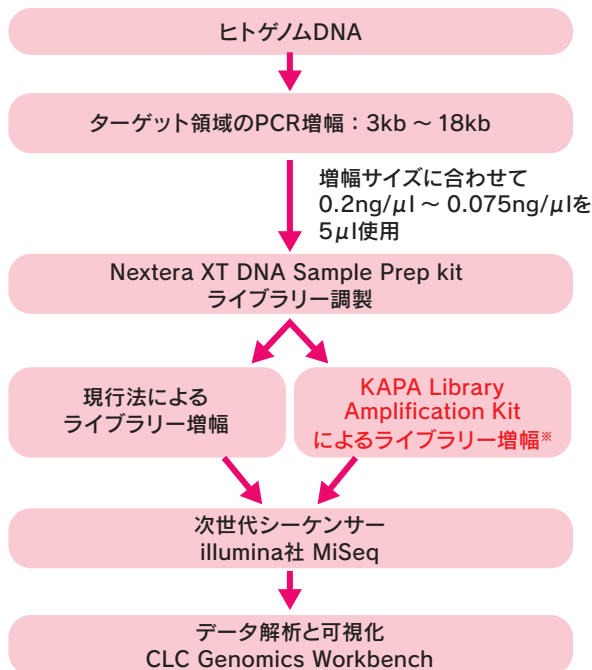
以下のアプリケーションデータは埼玉県立がんセンター 腫瘍診断・予防科 山本 剛 様、角田 美穂 様、部長 赤木 究 様のご厚意により掲載させていただきました。

実験方法

遺伝性大腸がん原因遺伝子のひとつPMS2遺伝子をターゲットとした長鎖アンプリコンのシーケンスでは、特にATリッチ領域におけるライブラリー増幅バイアスによりリード数が減少し、カバレッジが低くなることが問題となっていた。

今回、現行法である「長鎖アンプリコンからNextera XTで作成したTagmentation後のライブラリー」において、KAPA Library Amplification Kit (KAPA HiFi HotStart ReadyMix) を用いてライブラリーを増幅することで、この問題点の改善を試みた。

■ ワークフロー



※KAPA Library Amplification Kitによるライブラリー増幅

- ① Tagmentationの中和ステップ後、25μlの反応液に2倍量(50μl)の AMPureXPを添加し、クリーンアップを実施(80%エタノール洗浄×2回)
- ② 15μlの10mM Tris-HCl, pH 8 あるいは PCR-grade water で溶出
- ③ 以下の条件でライブラリー増幅を実施

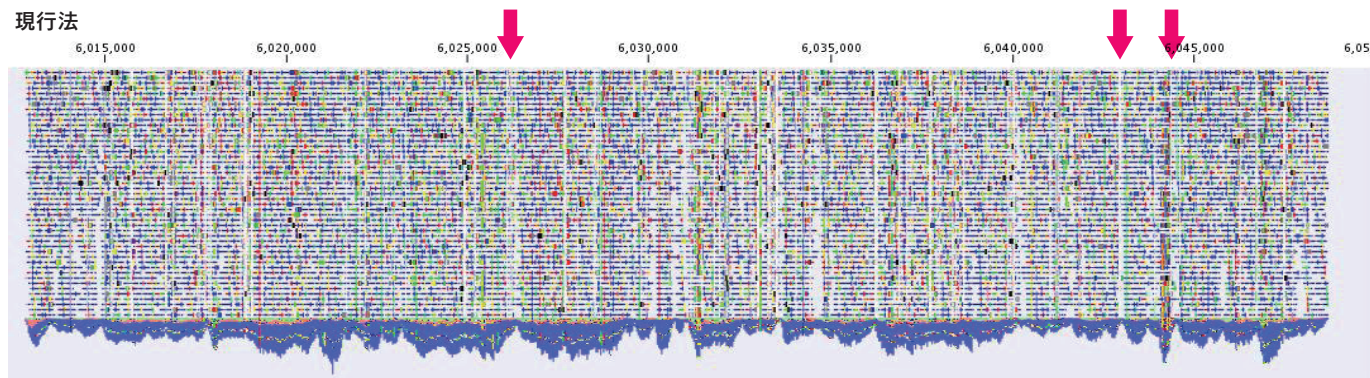
反応組成

2×KAPA HiFi HS ReadyMix	25μL
Index 1 primer	5μL
Index 2 primer	5μL
Library DNA	15μL
<hr/>	
	50μL RXN

PCR サイクル

Initial Extension	72°C	3min	} 14cycles
Denaturation	98°C	30sec	
Denaturation	98°C	10sec	
Annealing	63°C	30sec	
Extension	72°C	3min	
Hold	10°C		

現行法

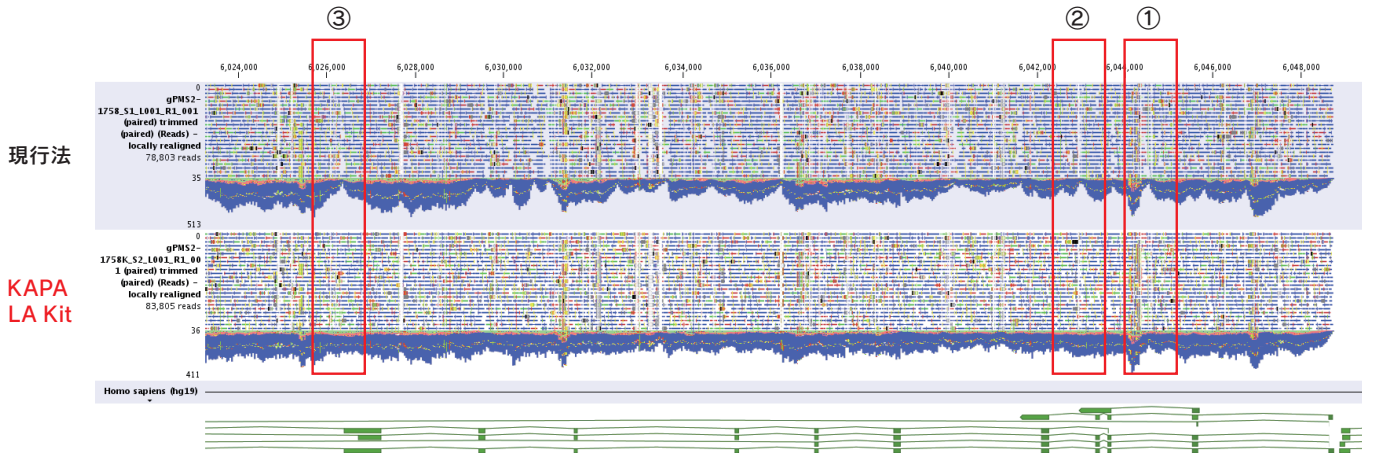


PMS2遺伝子を標的とした長鎖アンプリコンシーケンスの結果 ATリッチ領域 (例えば矢印の領域) などではリード数が減少し、カバレッジの低下が見られる。



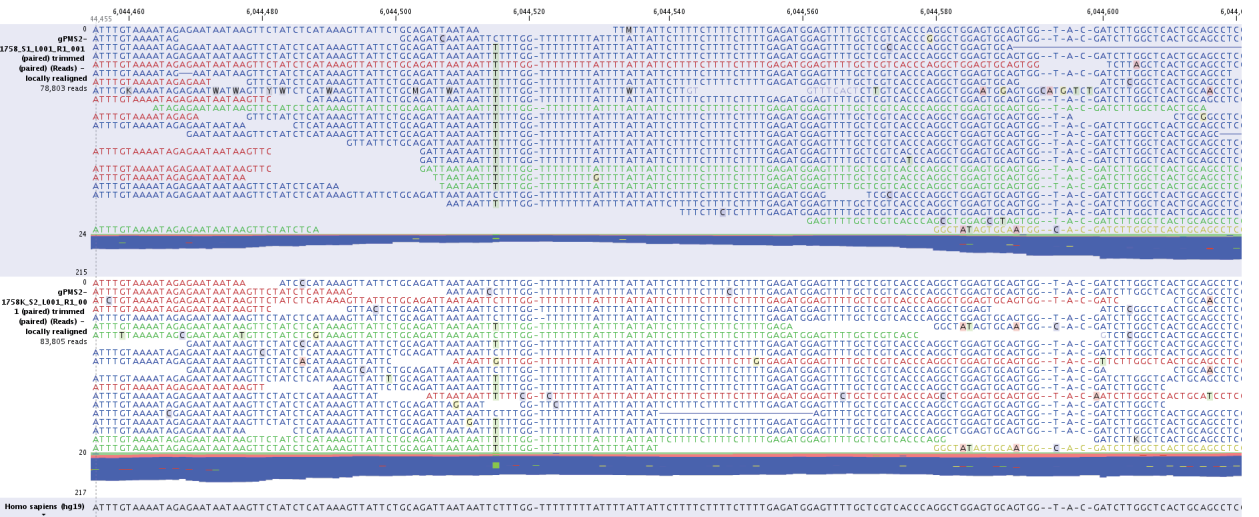
結果

KAPA Library Amplification (LA) Kitを用いてライブラリー増幅を行った結果、ATリッチ領域でのカバレッジの改善が見られ、より平均的なカバレッジを得ることができた。



① PMS2 intron2

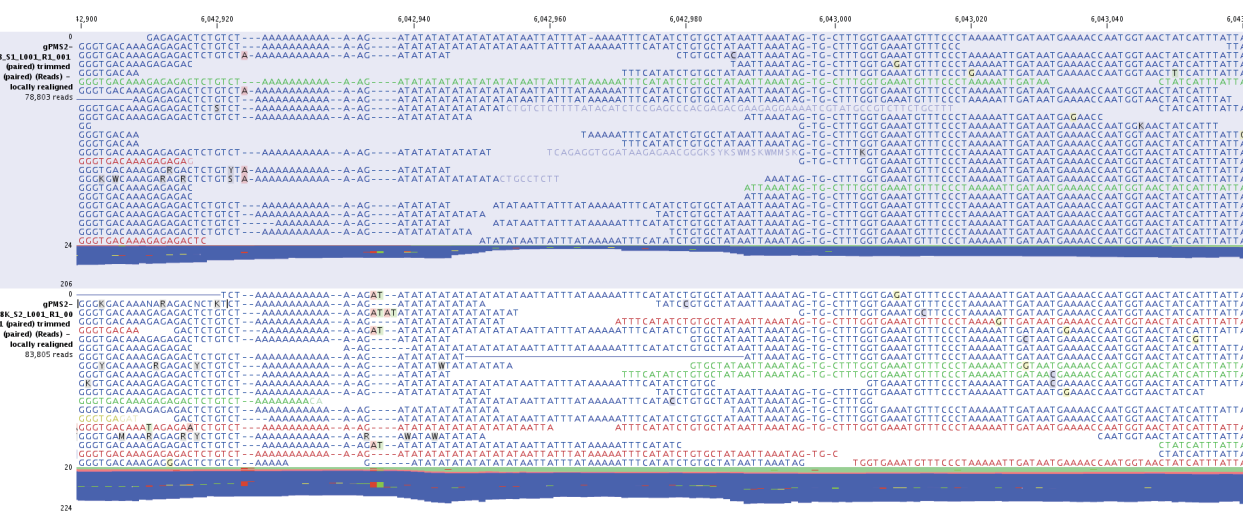
現行法



KAPA LA Kit

② PMS2 intron4

現行法

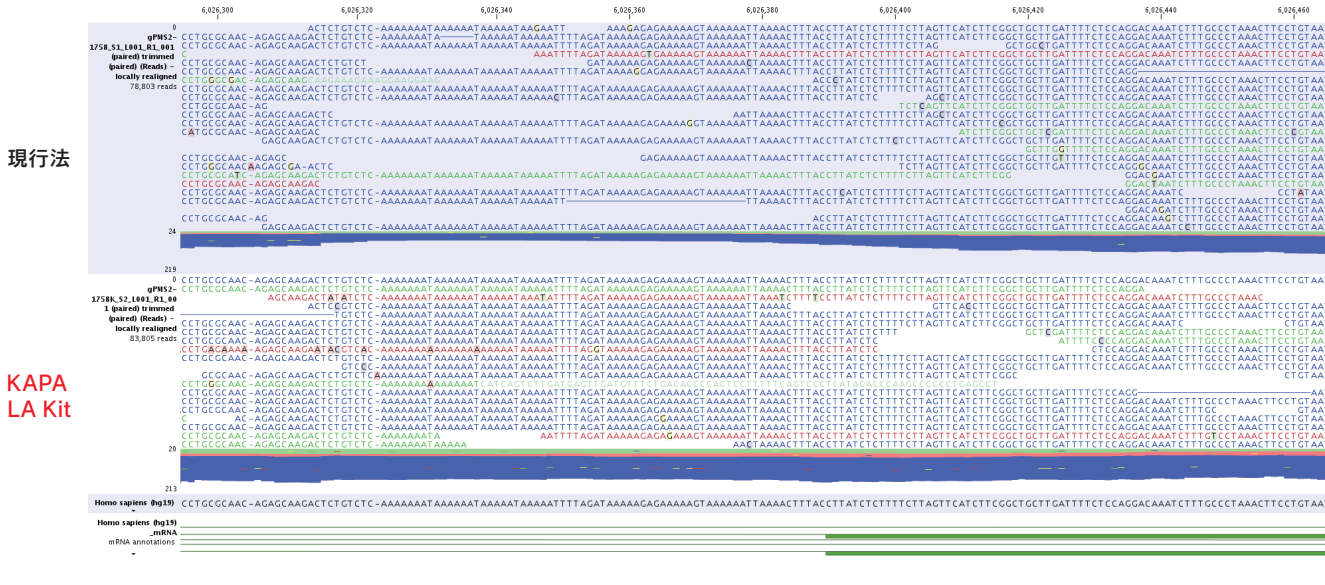


KAPA LA Kit



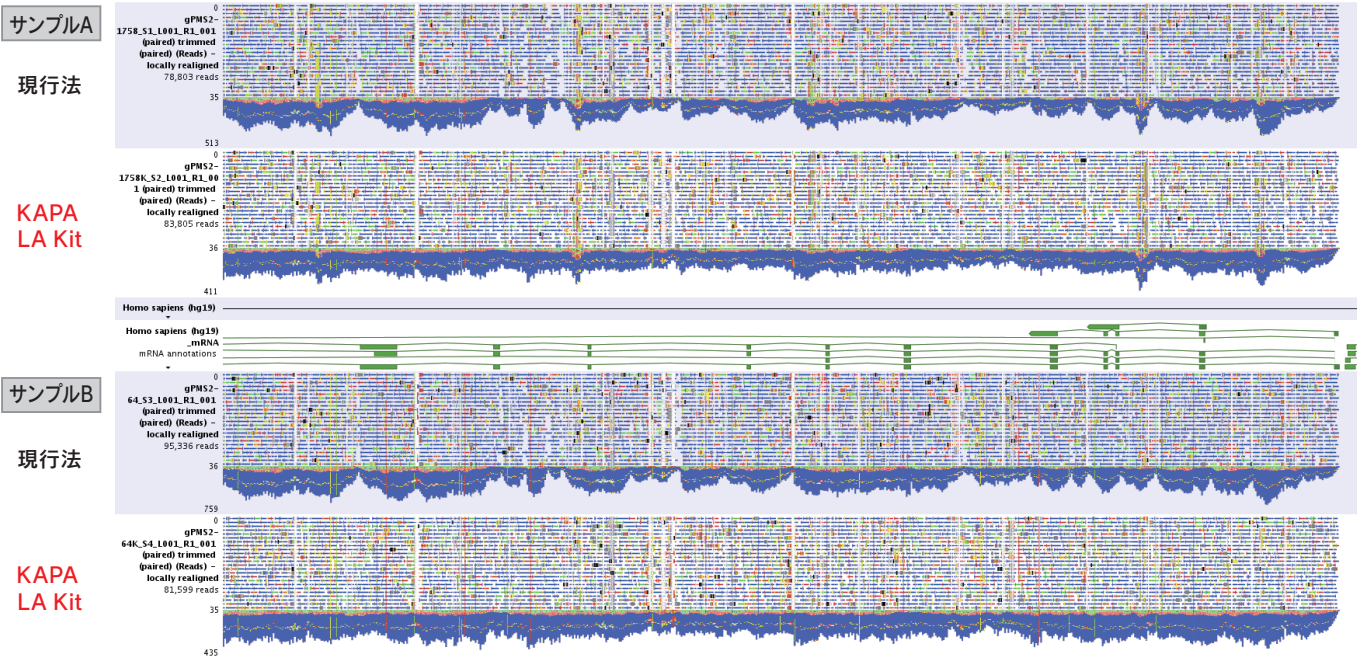
結果

③ PMS2 intron11_ Exon11



他のサンプル (下段サンプルB) でも同様に、KAPA LA Kitを用いてライブラリー増幅した結果、カバレッジの改善が見られた。

PMS2 Exon1_ Exon11



お客様のコメント

KAPA Library Amplification Kit (KAPA HiFi HotStart ReadyMix) を用いてATリッチな配列の増幅を行った所、かなりの結果改善が見られました。

