



Application

KAPA HyperPlus Kitを用いた QIAgility全自動ライブラリ作製

製品名

KAPA HyperPlus Kit (for illumina) (KK8510, KK8512, KK8514)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) DNA シーケンシングセクション 新垣 奈々 様、小柳 亮 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

シーケンサーの出力塩基量が向上し、データ量当たりのコストが大きく低下したことにより、1回のシーケンスランで多数のサンプルを同時に解析することが日常的になりました。多数のサンプルを用いることには様々な利点がありますが、その一方で多サンプルのライブラリ作成における作業者の負担が問題になります。KAPA HyperPlus Kitでは、以前のキットに比べ手順が簡素化されていますが、それでもサンプル数が増えると時間がかかる上に人為的ミスを起こすリスクが増え、結果としてデータの精度や再現性にばらつきが生じる可能性があります。

年々ライブラリ作成数が増加する中で、この問題を根本的に解決するには機械による自動化が必要であると考え、まずは各段階の反応液調製を自動分注装置により行うことにしました。分注装置としては、液面センサー搭載により正確なピペティングが実行でき、これにより動作中の監視が必要のないQIAGEN社のQIAgilityを使用しました。

KAPA HyperPlus KitではDNAの断片化からアダプタのライゲーションまでを1チューブで実施可能なため分注装置との相性が良く、これにより、多数のライブラリが迅速かつ簡便に作製できるようになりました。また、後処理の工程にも分注装置を導入することで、サンプル間のばらつきが少ない安定したデータ取得が実現しました。

Workflow

KAPA社 KAPA HyperPlus Kit

QIAGEN社 QIAgility

1. ゲノム DNA の抽出

2. サンプルを 500ng/30uL(=16.67ng/uL) に調製

QIAgility : Normalization program

3. Fragmentation PreMix をサンプル数 (+ デッドボリューム) 分調製

4. Fragmentation PreMix を 20 μL 添加

QIAgility : Fragmentation program

5. Fragmentation 37°C, 10min

6. EndRepair and A-tailing 溶液をサンプル数 (+ デッドボリューム) 分調製

7. EndRepair and A-tailing 溶液を 10 μL 添加

QIAgility : EndRepair and A-Tailing

8. EndRepair and A-tailing 反応

9. Adapter Ligation 溶液をサンプル数 (+ デッドボリューム) 分調製

10. Adapter Ligation 溶液を 50 μL 添加

QIAgility : Adapter Ligation

11. Adapter Ligation 反応

12. Post Ligation clean up by AMPure

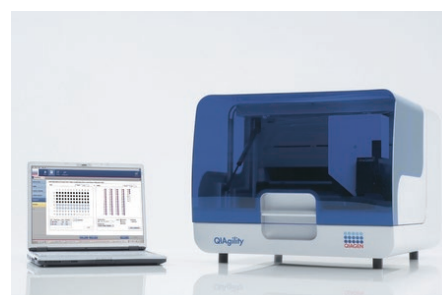
13. Double size selection by AMPure

14. Post Clean-up by AMPure

15. Library Quantification by dPCR



© QIAGEN, all rights reserved



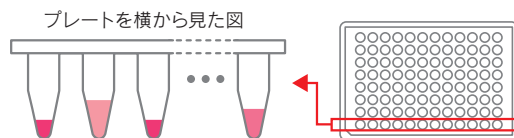
© QIAGEN, all rights reserved

KAPABIOSYSTEMS



KAPA HyperPlus Kitを用いたQIAGEN社QIAgility全自動ライブラリ作製
1. ゲノムDNAの抽出

抽出方法：CHAOS法 (グアニジンチオシアネート主体)
 バッファー組成：AE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH9.0)


2. サンプルを500ng/30 μ L (=16.67ng/ μ L) に調製

3. Fragmentation PreMixをサンプル数 (+デッドボリューム) 分調製

Component	Volume/sample
10X KAPA Frag Buffer	5 μ L
KAPA Frag Enzyme	10 μ L
Diluted Conditioning Solution*	5 μ L
Total	20 μ L

注意

Conditioning solutionの調製方法
 AE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH9.0)
 Sample 30 μ Lを用いた
 反応液50 μ L中のEDTA濃度は0.3mM

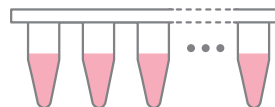
Conditioning solution 21.0 μ L
 PCR-grade water 79.0 μ L
 total 100.0 μ L
 ... Diluted Conditioning solution

Conditioning solution の組成

Final EDTA concentration in 50 μ L rxn	Dilution Factor	Volume of Conditioning Solution (per 100 μ L)	Volume of PCR-grade water (per 100 μ L)
0.02-0.05 mM	32.0	3.1 μ L	96.9 μ L
0.1 mM	15.4	6.5 μ L	93.5 μ L
0.2 mM	7.4	13.5 μ L	86.5 μ L
0.3 mM	4.8	21.0 μ L	79.0 μ L
0.4 mM	3.3	30.0 μ L	70.0 μ L
0.5 mM	2.6	38.8 μ L	61.2 μ L
0.6 mM	2.2	46.5 μ L	53.5 μ L
0.7 mM	1.8	56.0 μ L	44.0 μ L
0.8 mM	1.6	64.0 μ L	36.0 μ L
0.9 mM	1.4	72.0 μ L	28.0 μ L
1.0 mM	1.3	80.0 μ L	20.0 μ L

4. Fragmentation PreMix を20 μ L添加
5. Fragmentation 37 $^{\circ}$ C,10min

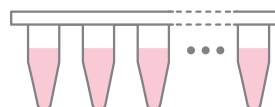
Mode fragment length	Incubation time at 37 $^{\circ}$ C
600bp	5 min
350bp	10 min
200bp	20 min
150bp	30 min


6. EndRepair and A-tailing溶液をサンプル数 (+デッドボリューム) 分調製

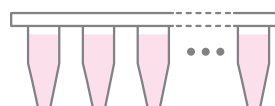
Component	Volume/sample
End Repair & A-Tailing Buffer*	7 μ L
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix*	3 μ L
Total volume	10 μ L

7. EndRepair and A-tailing溶液を10 μ L添加
8. EndRepair and A-tailing反応

Step	Temp	Time
End repair and A-tailing	65 $^{\circ}$ C	30min
HOLD	4 $^{\circ}$ C	∞


9. Adapter Ligation溶液をサンプル数 (+デッドボリューム) 分調製

Component	Volume/sample
Adapter stock (concentration as required)	5 μ L
PCR-grade water	5 μ L
Ligation Buffer	30 μ L
DNA Ligase	10 μ L
Total volume	50 μ L

10. Adapter Ligation溶液を50 μ L添加
11. Adapter Ligation反応
12. Post Ligation clean up by AMPure
13. Double size selection by AMPure
14. Post Clean-up by AMPure
15. Library Quantification by dPCR


※溶液の色は、イメージです。
 実際にこの溶液の色になるわけではありません。



実験条件

● サンプルDNA

生物種 : *Acropora digitifera* (コブビミドリイシ)

抽出方法 : CHAOS法 (グアニジンチオシアネート主体)

サンプルDNAのバッファー組成 : AE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH9.0)

● 断片化条件

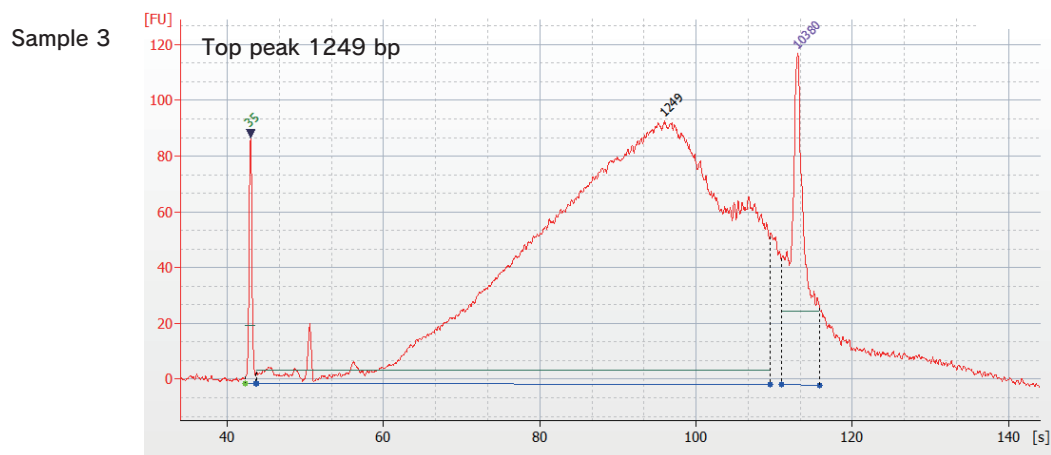
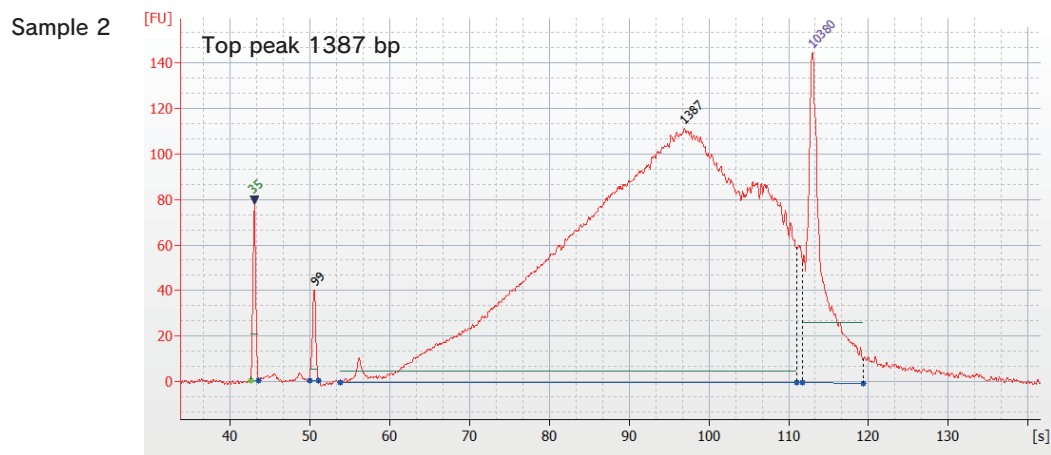
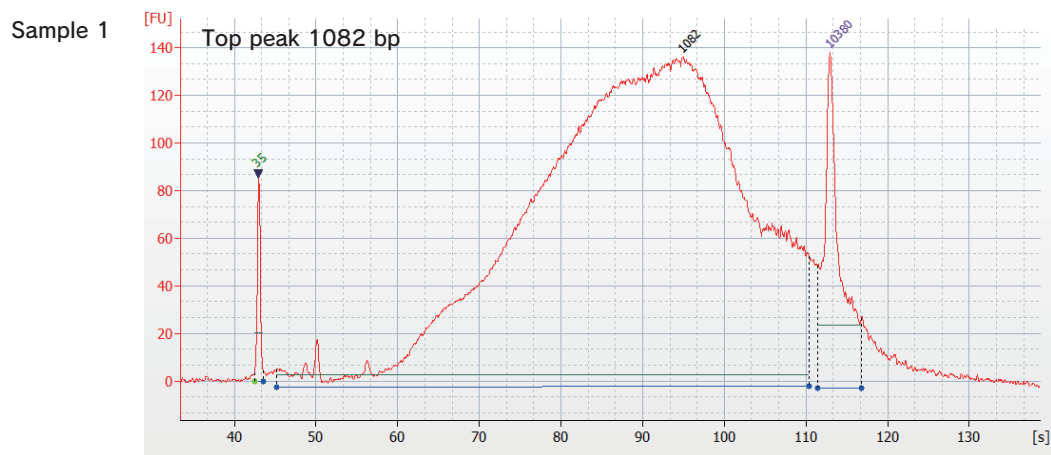
温度 : 37°C

時間 : 10min

Target size : 300-400bp

結果

1回目のPost Clean-up後のBioanalyzerのデータは下記である。



目的サイズのライブラリが調製できていることが確認できた。

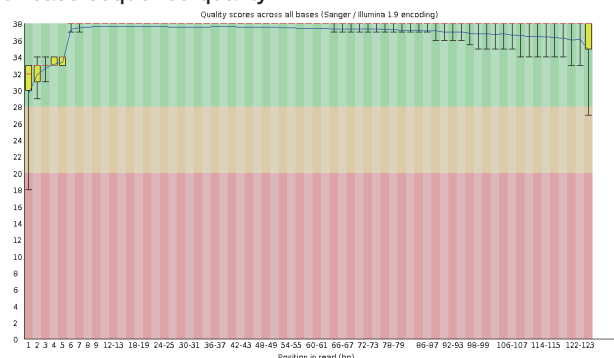
※ただし、イルミナのフォークアダプターを付加しているため、大きめのサイズに見える

FASTQCデータ

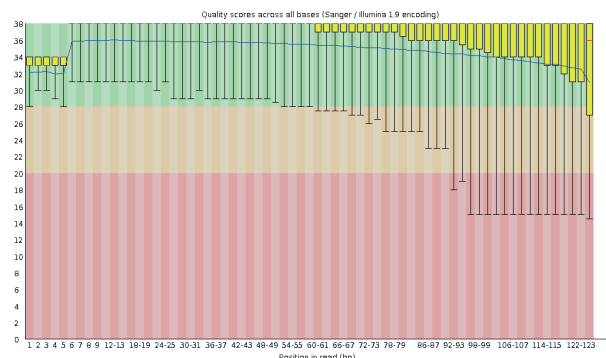
Sample 1

Per base sequence quality

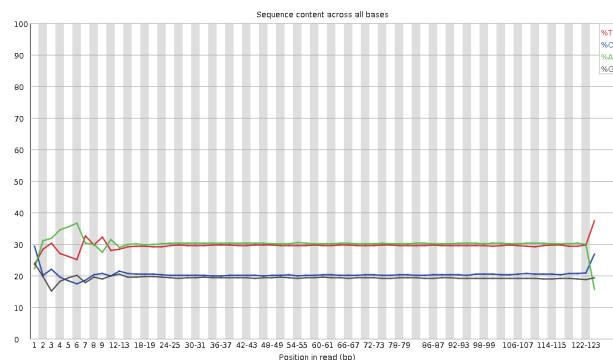
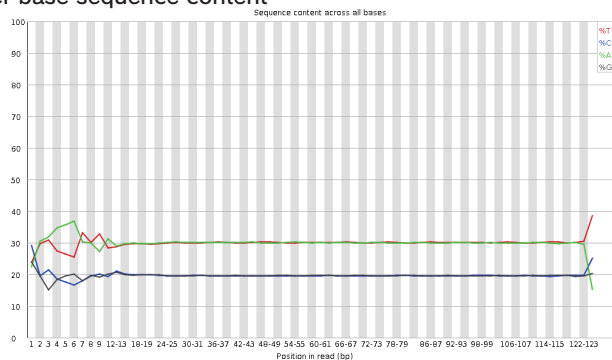
read1



read2

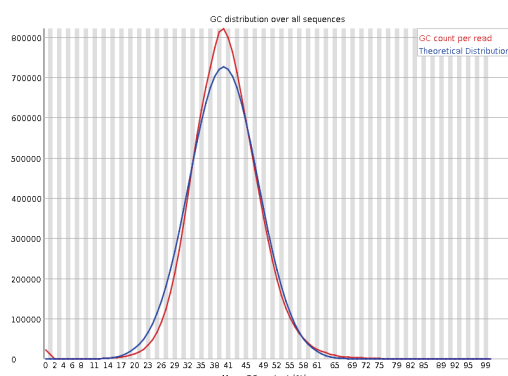
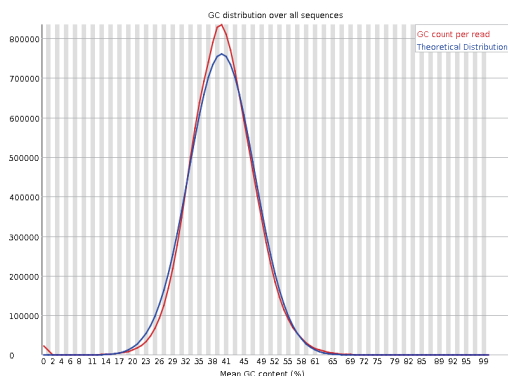


Per base sequence content



KAPA HyperPlusでは、超音波断片化装置と比較して、断片化の際に切断される場所が偏っているようだが、OISTでのこれまでの解析では問題はない。

Per sequence GC content



● まとめ

KAPA HyperPlus KitとQIAgilityの組合せにより、多数のライブラリが迅速かつ簡便に作製できた。
また、安定的に再現性よくデータを得ることができた。

濃度がまちまちな96本のDNAサンプルからそれぞれ同じDNA量を取るためにExcelで液量を計算していた時に、このデータをそのままQIAgilityに読み込ませれば自動化できると気づいたことがきっかけです。

DNA量がそろってしまえばあとは試薬を加え、シールしてサーマルサイクラーにかける作業を繰り返すだけなので簡単です。

多サンプルでは時間と労力を大幅に低減できるのももちろんですが、サンプルが少ない場合でも安定性と再現性の良さからQIAgilityを使用するようになりました。

これまでのライブラリ作成では、DNA断片化をPCRチューブで行うことができないため、酵素反応でチューブフォーマットを変更する必要があったのに対し、KAPAHyperPlusキットは断片化からライゲーションまでone-tubeで行えるように設計されているため、自動化への親和性が高いことが特徴です。

このため、今回ライブラリ作成の自動化が実現したのはKAPAHyperPlusKitの存在に依るところが大きいです。



お客様のコメント