



Application

KAPA Frag酵素による安定的な目的サイズ分布を示すDNA断片化

～ Ion Protonでのsingle cell RNA-Seq用ライブラリー調製におけるcDNAの断片化方法 ～

製品名

KAPA Frag Kit (KK8600, KK8601, KK8602)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、国立研究開発法人 国立がん研究センター 研究所 エピゲノム解析分野 ユニット長 山下 聡先生のご厚意により掲載させていただきました。

はじめに

ライゲーションをベースとしたライブラリー調製の前処理として、シーケンスに供するDNAを、シーケンスに適した目的サイズに断片化することが求められます。

一方、サンプル数が多い場合、断片化条件を各サンプル毎に最適化し、同じサイズに断片化することは困難となります。

今回は、Ion ProtonシステムでのcDNAからのRNA-Seq用ライブラリー調製におけるcDNAの断片化処理において、DNA断片化用試薬KAPA Frag Kitを用いたことで、サンプル間でバラつきが少なく、安定的に目的サイズのDNA断片が得られた事例をご紹介します。

ワークフロー

1. cDNAの精製

cDNA 溶液2 μ L (cDNA 1 μ g 相当) を AMPureXP で精製
10mM Tris HCl Buffer(pH8.0) 36 μ L で溶出し、35 μ L を回収

2. KAPA Frag Kit によるDNA断片化

① 氷上で酵素反応液の調製

| | |
|----------------------|------------|
| AMPureXP で精製したDNA | 35 μ L |
| 10X KAPA Frag Buffer | 5 μ L |
| KAPA Frag Enzyme | 10 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 50 μ L |

② 断片化反応 37°C 35min

* 予備実験で決定した条件

③ 氷上でStop Solution 5 μ Lを添加し、ピペティングで混合

3. AMPureXPによる精製

① ビーズ精製 (×1.8)

| | |
|----------|------------|
| 反応液 | 55 μ L |
| AMPureXP | 99 μ L |

ピペティングで十分攪拌後、5分静置し、マグネット上で上清を除去

② 洗浄

70%EtOH 洗浄 200 μ L x2回

③ 溶出

10mM Tris HCl Buffer(pH8.0) 36 μ L で溶出し、35 μ L を回収

4. PicoGreen®によるDNA定量およびTapeStationによるサイズ分布確認

5. ライブラリー調製

6. IonProtonによるシーケンス



KAPA Frag Kit

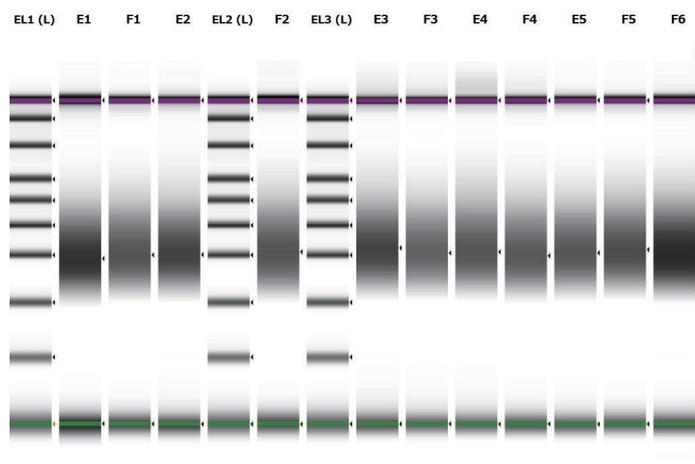
KAPA Frag Kitに採用されているDNA断片化用酵素 (KAPA Frag酵素) は、次世代シーケンスのサンプル処理に必要なDNA断片化を目的に開発されました。

断片化のバイアス (DNAのGC含量や配列によるバイアス) が生じ難い酵素が採用されており、更に、インプットDNAのサイズや量に依存せず、温度と時間で断片サイズをコントロールすることが可能です。



結果

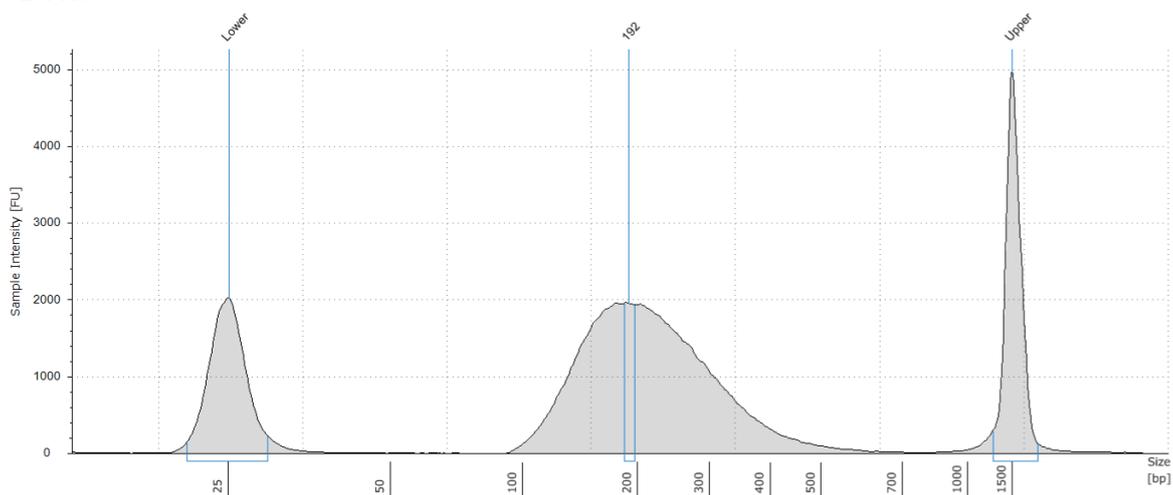
1. KAPA Frag Kit によるDNA断片化のサイズ分布



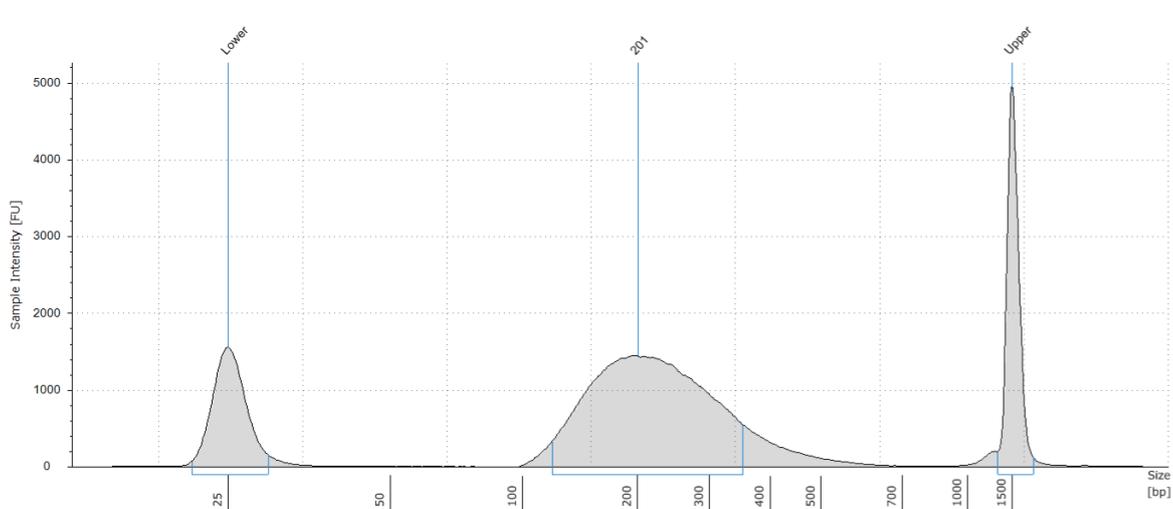
Sample Info

| Well | Sample Description | Size (bp) |
|------|--------------------|-----------|
| EL1 | Electronic Ladder | |
| E1 | KO1 | 192 |
| F1 | WT1 | 201 |
| E2 | KO2 | 201 |
| EL2 | Electronic Ladder | |
| F2 | WT2 | 211 |
| EL3 | Electronic Ladder | |
| E3 | KO3 | 224 |
| F3 | WT3 | 207 |
| E4 | KO4 | 211 |
| F4 | WT5 | 199 |
| E5 | KO5 | 207 |
| F5 | WT6 | 218 |
| F6 | WT7 | 201 |

E1: KO1



F1: WT1



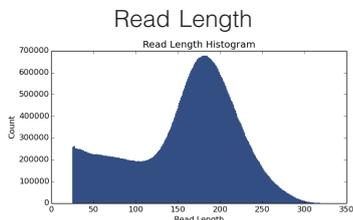
KAPA Frag Kit を用いた結果、均一なサイズ分布に断片化されていることが確認された。

2. シーケンス結果

以下のように、期待どおりのシーケンス結果が得られた。

① Run Summary

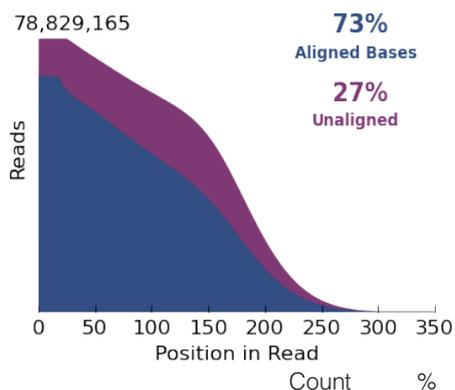
158bp **170bp** **182bp**
 Mean Median Mode



| Barcode Name | Sample | Bases | ≥Q20 | Reads | Mean Read Length |
|---------------|--------|---------------|-------------|-----------|------------------|
| lonXpress_081 | KO1 | 896,832,710 | 779,998,143 | 5,808,385 | 154 bp |
| lonXpress_082 | KO2 | 960,770,582 | 835,661,464 | 6,097,664 | 158 bp |
| lonXpress_083 | KO3 | 711,775,994 | 621,885,185 | 4,397,380 | 162 bp |
| lonXpress_084 | KO4 | 916,293,475 | 792,425,579 | 5,843,541 | 157 bp |
| lonXpress_085 | KO5 | 1,111,950,579 | 965,733,438 | 6,983,688 | 159 bp |
| lonXpress_086 | KO6 | 804,206,585 | 698,752,122 | 5,081,347 | 158 bp |
| lonXpress_087 | WT1 | 1,020,360,953 | 892,232,606 | 6,227,964 | 164 bp |
| lonXpress_088 | WT2 | 1,009,453,122 | 879,267,105 | 6,048,007 | 167 bp |
| lonXpress_089 | WT3 | 1,073,947,054 | 928,734,315 | 6,774,391 | 159 bp |
| lonXpress_090 | WT4 | 1,078,999,073 | 942,141,796 | 6,884,147 | 157 bp |
| lonXpress_091 | WT5 | 986,229,625 | 859,795,372 | 6,227,131 | 158 bp |
| lonXpress_092 | WT6 | 991,663,277 | 860,141,966 | 6,169,506 | 161 bp |
| lonXpress_093 | WT7 | 953,159,781 | 826,010,242 | 6,286,014 | 152 bp |

② Alignment Summary

TotalAlignmentBases AverageCoverage
 9.17G DepthofReference
 3.0X



Alignment Quality

| | AQ17 | AQ20 | Perfect |
|-----------------------------|--------|--------|---------|
| Total Number of Bases [Mbp] | 6.57 G | 5.64 G | 4.32 G |
| Mean Length [bp] | 134 | 123 | 99 |
| Longest Alignment [bp] | 348 | 341 | 335 |
| Mean Coverage Depth | 2.1 | 1.8 | 1.4 |

| | Count | % |
|-----------------|------------|-------|
| Total Reads | 78,829,165 | - |
| Aligned Reads | 68,225,498 | 86.5% |
| Unaligned Reads | 10,603,667 | 13.5% |



お客様のコメント

NGSライブラリのためのDNA断片化において、物理的な断片化方法も考えましたが、元のDNAの量やサイズがバラバラだと、この方法では常に同じサイズに揃えるのは難しい。
 酵素を用いた容易な断片化法を求めていたところ、KAPA Frag Kitがあったので早速試しました。
 元のDNAの長さが数キロだろうがゲノムだろうがほぼおなじ条件でよいようなので、条件検討は反応時間の確認だけで済みました。
 あまりにも簡単に、均一なDNA断片化ができたので感動しました。