



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 $\mu$ L (cDNA 1 $\mu$ g 相当) を AMPureXP で精製  
10mM Tris HCl Buffer(pH8.0) 36 $\mu$ L で溶出し、35 $\mu$ 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 $\mu$ L
10X KAPA Frag Buffer	5 $\mu$ L
KAPA Frag Enzyme	10 $\mu$ L
<hr/>	
Total	50 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L
AMPureXP	99 $\mu$ 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 $\mu$ L x2回

#### ③ 溶出

10mM Tris HCl Buffer(pH8.0) 36 $\mu$ L で溶出し、35 $\mu$ 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

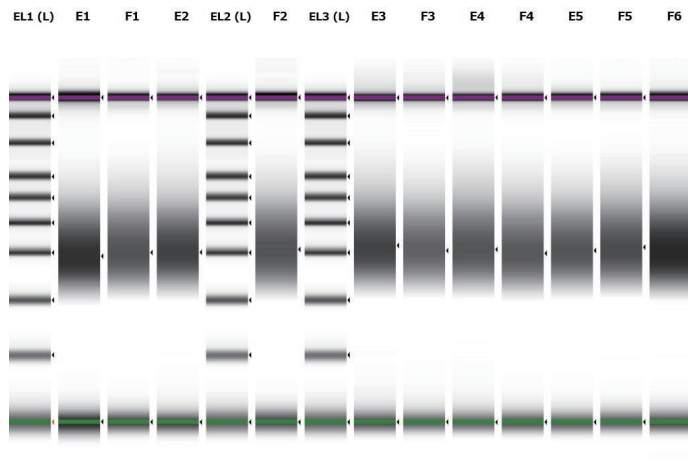
KAPA Frag Kitに採用されているDNA断片化用酵素 (KAPA Frag酵素) は、次世代シーケンスのサンプル処理に必要なDNA断片化を目的に開発されました。

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

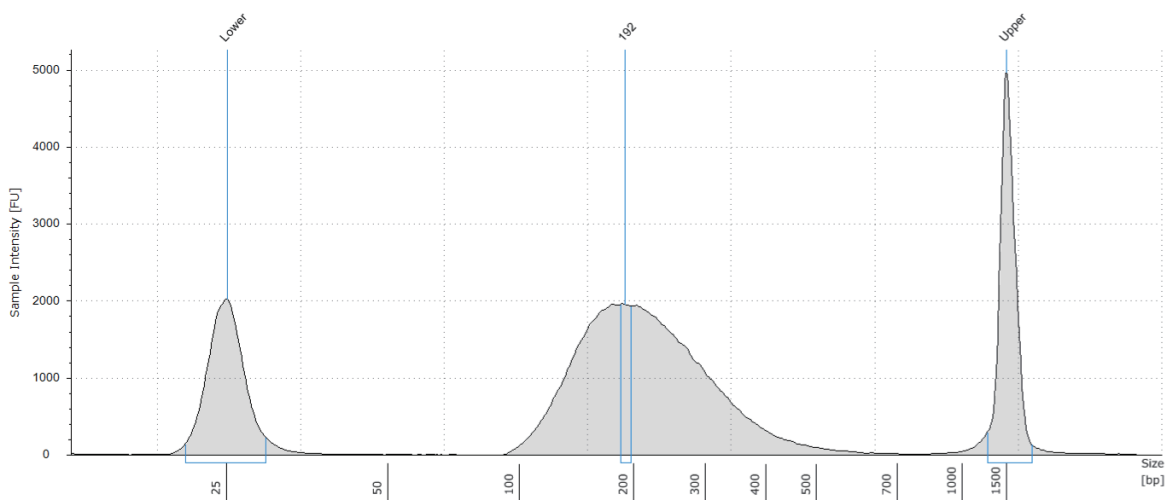
## 1. KAPA Frag Kit によるDNA断片化のサイズ分布



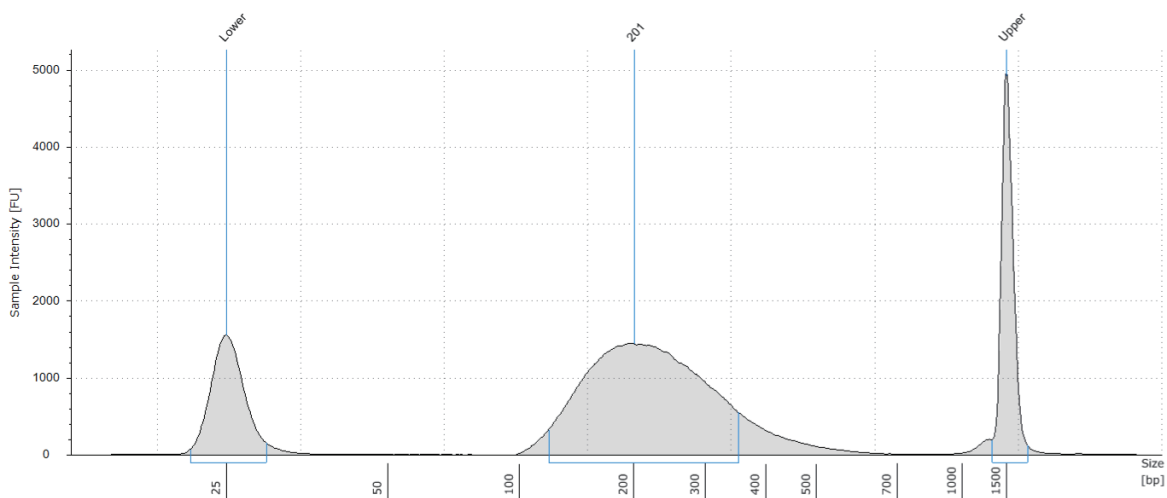
## Sample Info

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



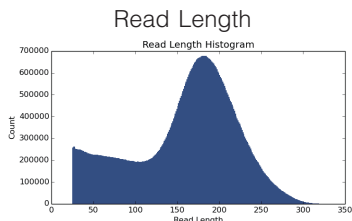
KAPA Frag Kit を用いた結果、均一なサイズ分布に断片化されていることが確認された。

## 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

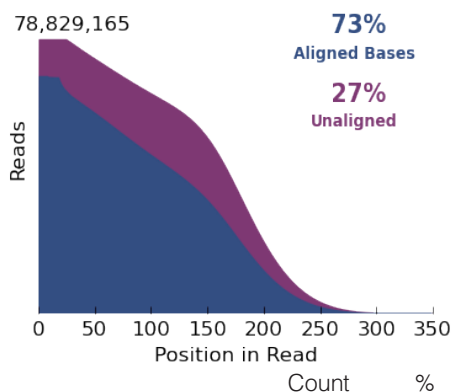
**158bp**    **170bp**    **182bp**  
 Mean      Median      Mode



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  
 DepthofReference  
**9.17G**                      **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。