

## Application

# KAPA HyperPureBeadsを使用した ライブラリー精製法でのナノポアシーケンスの評価試験

## 製品名

KAPA HyperPure Beads (Cat.No. KK8007)  
Short Read Eliminator Kit (Cat.No. SS-100-101-01)

## メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS  
Pacific Biosciences

下記のデータは、信州大学 繊維学部 応用生物科学科 田口 悟朗様のご厚意により掲載させていただきました。

## 背景

Oxford Nanopore Technologies社のMinIONを使用したシーケンスはUSBでPCにつながる小型シーケンサーとして関心が高く、ロングリードのシーケンスが取得できる装置として注目を集めている。

ロングリードのライブラリーを作成する際、ライブラリーをせん断する事なく精製を行う工程も非常に重要となるが、ナノポア社のライブラリー調製キットには精製時に使用するビーズは含まれておらず、専用のプロトコルでは別途他社のビーズを使用する事が推奨されている。

本アプリケーションノートでは、ビーズ精製の操作工程を変える事なく精製用のビーズをKAPA HyperPure Beadsに置き換えても使用できるか、また、作成したライブラリーで得られたシーケンスに問題がないか検証を行った。

## 評価方法

## DNA抽出

① NucleoBond® HMW DNA Kit (Macherey-Nagel) を使用してDNA抽出

## サイズセレクション

② アガロースゲル電気泳動でサイズ確認

③ Short Read Eliminator Kit (SS-100-101-01 : Pacific Biosciences) を使用して10 Kbp以上のDNAサンプルをサイズセレクション

④ アガロースゲル電気泳動で短いフラグメントが除去されたことを確認

## ライブラリー調製

⑤ NanoDropによるDNA濃度の確認

⑥ 1D Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK110 : Oxford Nanopore Technologies) を使用してライブラリー調製

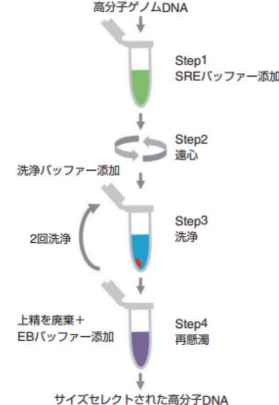
## シーケンス

⑦ NanoDropによるライブラリーの濃度測定

## データ解析

⑧ MinION (Oxford Nanopore Technologies)

## Short Read Eliminator Kitの反応ステップ

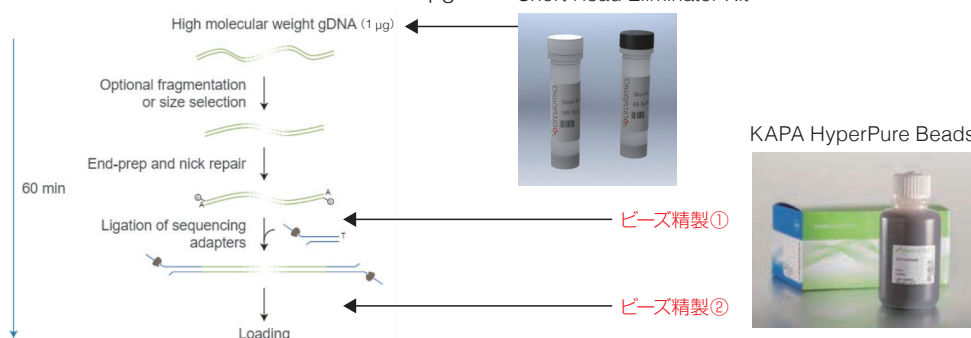


## 実験条件

- 初発サンプル 植物Aの組織由来サンプル (0.14 g)
- DNA抽出方法 NucleoBond HMW DNA Kit (Macherey-Nagel社) を使用して精製したゲノムDNA  
※植物材料の状態の問題で断片化が進んでいたが、サイズセレクションをして使用した。
- サイズセレクション SREで短いフラグメントをカット  
使用したKit : Short Read Eliminator Kit (SS-100-101-01) (Pacific Biosciences)
- サンプルの確認 電気泳動で短いフラグメントが除去されたことを確認した。その後、NanoDropで濃度を測定
- ライブラリー調製Kit 1D Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK110) (Oxford Nanopore Technologies)
- 使用したサンプル数 1サンプル

## ライブラリー調製ワークフロー

ライブラリー調製に使用したインプット量 : 1 µg

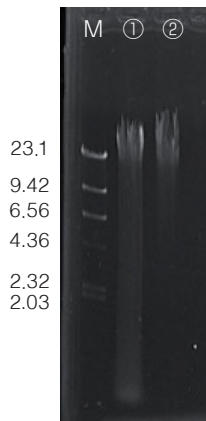


## 結果

### DNA抽出結果

植物Aから抽出したゲノムDNAは、アガロース電気泳動で、若干断片化が進んでいることが確認された(レーン①)が、もとのサンプルの状態に起因すると判断して、SREによるサイズセレクションを行った。その結果、短いフラグメントの大部分が除去され、10 Kbp以上である事が確認された。(レーン②)。

0.7%アガロースゲル電気泳動によるサイズセレクション結果の確認



M : λ-HindIII マーカー

①: SRE 処理前のゲノムDNA

(176.5 ng/μL, OD260/280 1.90)

②: SRE 処理後のゲノムDNA

(126.4 ng/μL, OD260/280 1.70)

各 2 μL ずつ泳動した。

### ライブラリー調製結果

サイズセレクションしたゲノムDNA 1 μg を用いてライブラリー調製を行ったところ、右記の濃度となった (Total 15 μL)。このライブラリー全量を MinION のフローセルに添加し、24 時間の run を行った。

濃度測定結果 (Nano-drop により測定)

濃度	ライブラリー量
37.9 ng/μL	15 μL

### Nanopore Sequenceの結果

24 時間の run で推定 8.23 Gb のシーケンスが得られ、リード数は 920 k、推定の N50 は 19.73 Kbp であった。

#### Run summary

##### DATA OUTPUT

Estimated bases	Data produced
8.23 Gb	68.81 GB
Reads generated	Data written to disk
920.09 k	Estimated N50
	19.73 kb

##### RUN DURATION

Elapsed time

24 hours of 24 hours

Run status

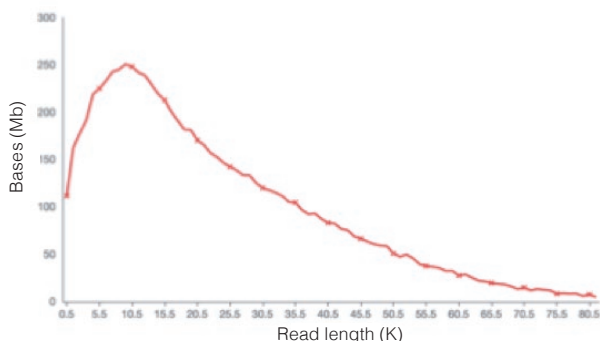
**Finished**

##### READ LENGTHS · OUTLIERS REMOVED

The read length graph shows the total number of bases vs the read length. The longest 1% of strands are classified as outliers, and excluded to allow focus on the main body of data.

Legend

Basecalled Estimated



##### OUTLIERS

The longest 1% of strands are classified as outliers, and aggregated into groups to show their relative amounts.

Read length (kb)	Aggregated reads (Mb)
80 - 144	78.94
144 - 208	3.02
208 - 272	None
272 - 336	0.34

## まとめ

抽出したゲノムDNAの状態(長さ)から考慮すると、元のサンプルの断片化が若干進んでいたため短いリード長も多くなったが、10 Kbp以上のロングリードのデータが十分量得る事ができた。

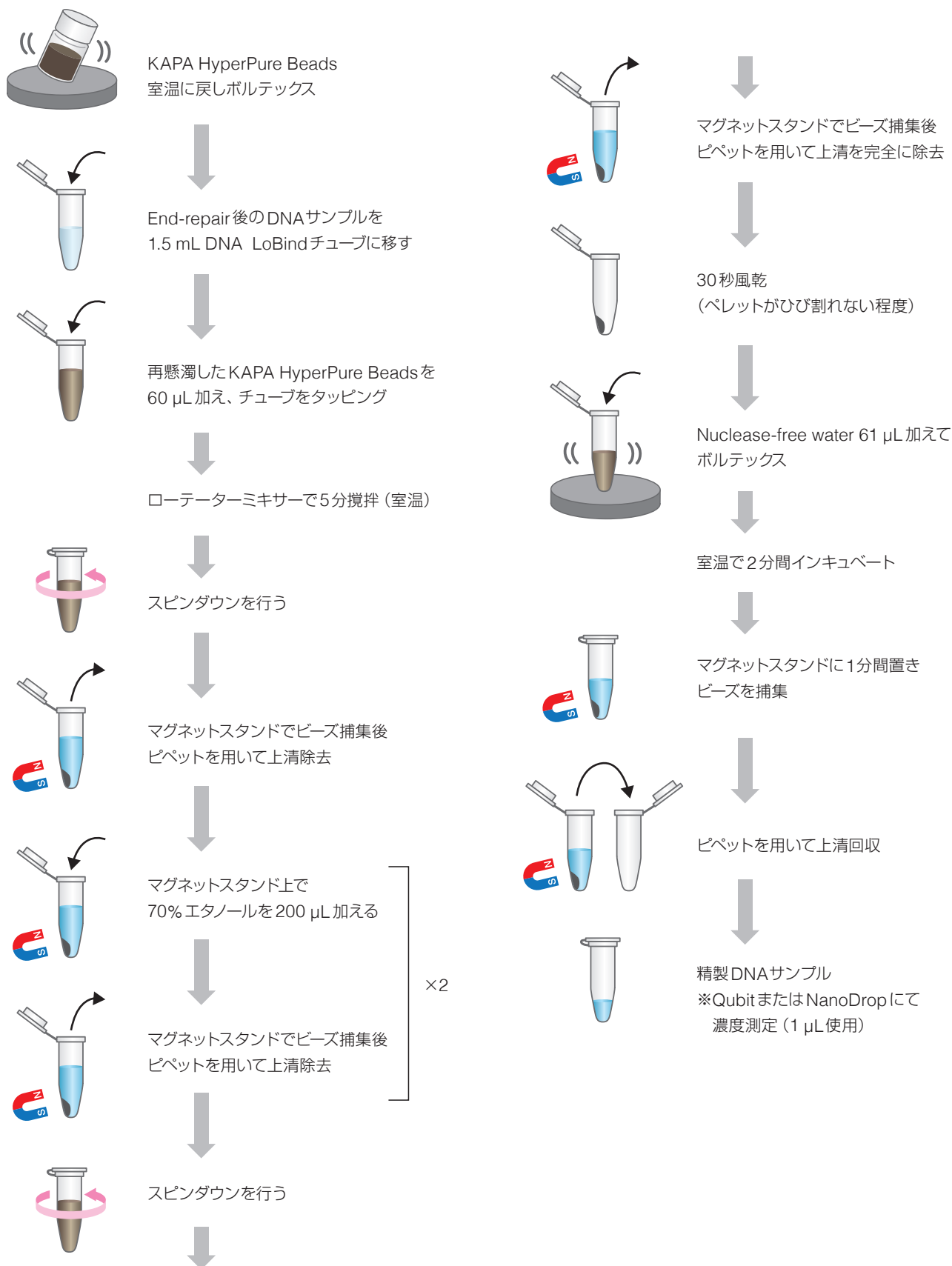


### お客様のコメント

Nanoporeのライブラリー調製には、そのまま使用できるので便利でした。DNAの濃縮も試してみましたが、想定どおりの収率でDNAを回収できました。操作も簡便なので、特に貴重なDNAサンプルの回収で効果を発揮すると思います。

## 補 足

## ビーズ精製① KAPA HyperPure Beadsを使用した精製Protocol



## ビーズ精製② KAPA HyperPure Beadsを使用した精製Protocol

