



Application

ライブラリー精製におけるKAPA HyperPure Beadsと他社磁気ビーズ使用時のNGSデータ比較

製品名

KAPA HyperPure Beads (Cat.No. KK8007)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS



下記のデータは、株式会社 KINS 渡邊 郁乃 様、皆川 望帆 様 のご厚意により掲載させていただきました。

概要

KAPA HyperPure Beads は、次世代シーケンスにおけるライブラリー調製やDNAの精製に最適化された磁性ビーズ懸濁液であり、原理的には他社ビーズ精製キットと同様に使用することが可能であると考えられる。弊社では、KAPA HyperPure Beads と他社製品Aを用いて作製したライブラリーのサイズと収量の比較検証を行っていたが、シーケンス結果までを比較したデータはなかった。(テクニカルノート2021 <06> 参照) 本資料では、KAPA HyperPure Beads と他社製品Aを使用して精製したライブラリーのシーケンス結果を比較した。その結果、KAPA HyperPure Beads を使用した場合でも、他社製品Aを使用した場合とほぼ変わらないデータが得られることを確認できた。

実験条件

- サンプル イヌの歯垢 (n=10)
- DNA抽出 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社) を使用してDNA抽出
- ライブラリー調製 1-step Tailed PCR法
- シーケンス Illumina MiSeq /PE250 (MiSeq Reagent Kit v2)
- データ解析 QIIME 2によるデータ解析

ワークフロー

1-step Tailed PCR

16S rRNA V1-V2 領域の増幅
およびインデックスの付加

サイクルステップ	温度	時間	サイクル数
初期変性	95℃	2分	1
変性	95℃	30秒	
アニーリング	55℃	45秒	30
伸長反応	72℃	1分	
最終伸長	72℃	10分	1
Hold	4℃	∞	

1-step Tailed PCR Primer配列

Forward : 5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC -[index 2 (i5)]-
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

Reverse : 5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT -[index 1 (i7)]-
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

PCR酵素: TaKaRa ExTaq Hot Start Version (タカラバイオ社)

338R

PCR後の精製

他社製品AおよびKAPA HyperPure Beads使用

*こちらの方法は、お客様のご使用方法となります(本製品の推奨のご使用方法につきましては、補足をご参照ください)

PCR産物	45 μL
+ Nuclease-free Water	45 μL
+ Beads (KAPA HyperPure Beads or 他社製品A)	100 μL
	190 μL

↓
ボルテックス後、5分間静置

↓
マグネットスタンドに設置して、5分間静置後、上清除去

↓
マグネットスタンド上で75%エタノールを加え、30秒間静置

↓
上清除去後、再度75%エタノールを加え、30秒間静置

↓
上清除去し、5分間風乾

↓
マグネットスタンドから外して、TE溶液を加え、2分間静置

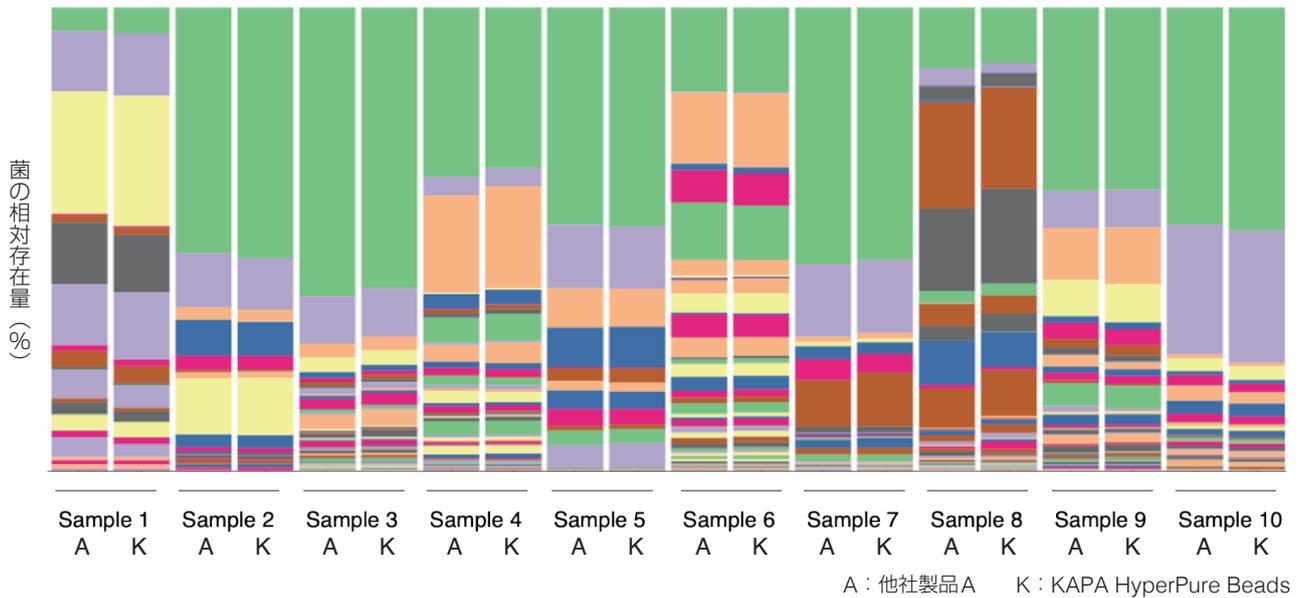
↓
マグネットスタンドに設置して、2分間静置後、上清回収

定量、プーリング

シーケンス

結果

ライブラリー精製で使用したビーズとNGSで得られた菌種の割合の比較



上のグラフにおいて、同色は同一菌種を示している。

10種類のサンプルにおいて、いずれも、隣りあった両者を比較した結果、菌種の割合はほぼ変わらなかった。

● まとめ・結論

本事例においては、精製時のビーズの違いによって、シーケンスデータに影響を与えないことが示された。

このことから、KAPA HyperPure Beadsは、KAPAのライブラリー調製キットでの使用にとどまらず、1-Step Tailed PCR法のような方法で調製を行ったライブラリーの精製工程において、他社製品の代用としても使用できることが示唆された。



お客様のコメント

実験中の使用感(粘度や操作性など)も他社製品を使っている時と遜色なく、実際にデータが出た時も変わりがないことが確認されました。

プロトコルを変更することなく使用でき、なおかつ安価なので、今後も継続して使用していきたいと思っています。

製品紹介

KAPA HyperPure Beads (KAPA BIOSYSTEMS / Cat.No. KK8007)

- 1回の反応で1 ng~5 µgのDNAを精製/サイズセレクションできる。
- バッファーは、最適化された濃度のPEG/NaClクラウディング成分を含んでおり、DNA分子がビーズに結合しやすい特徴がある。
- 濃度比を調整することで、DNA断片のサイズ分布の最適化が可能。
- 従来のスタンダード製品よりも比較的安価な製品。





補足

KAPA HyperPure BeadsによるNGSライブラリーの精製プロトコル

(取扱説明書より抜粋)

KAPA HyperPure Beadsを室温に戻し、使用前にボルテックスにより完全に懸濁する

↓

NGSライブラリー溶液にKAPA HyperPure Beadsを加える（推奨ビーズ量は右表を参照）

↓

ボルテックスあるいはピペティング後、室温で5分間静置

↓

マグネットスタンドに設置して、ビーズがマグネットに捕捉され溶液が透明になるまで静置

↓

上清除去

↓

マグネットスタンドに設置したまま、80%エタノール 200 μ Lを加え、30秒以上静置

↓

上清除去

↓

マグネットスタンドに設置したまま、80%エタノール 200 μ Lを加え、30秒以上静置

↓

エタノールをすべて除去し、3～5分間あるいはエタノールがすべて蒸発するまで風乾

↓

マグネットスタンドから外して、10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5を加えて懸濁後、室温で2分間静置

↓

マグネットスタンドに設置して、ビーズがマグネットに捕捉され溶液が透明になるまで静置

↓

上清回収

表. KAPA HyperPure Beadsによる断片化DNA、NGSライブラリー、アンプリコンの精製のガイドライン

保持されるDNAのサイズ	サンプル溶液量に対して推奨されるKAPA HyperPure Beadsの溶液量
≥ 600 bp	0.5倍
≥ 400 bp	0.6倍
≥ 300 bp	0.7倍/0.8倍
≥ 200 bp	0.9倍
≥ 150 bp	1.5倍
≥ 100 bp	2.2倍～3倍

