

KAPAライブラリー増幅キット



クイックガイド

Cat.No.		
KK2610	10反応 (トライアルキット)	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) 1×0.25ml (10×50μl 反応)
KK2611	50反応	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) 1×1.25ml (50×50μl 反応)
KK2612	250反応	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) 1×6.25ml (250×50μl 反応)

1. 製品概要

ハイフィデリティー PCRは、適切なアダプター配列を含むライブラリー断片を選択的にエンリッチし、シーケンス前のDNA量を増幅させる場合に使用します。ライブラリーの増幅は、PCRバイアスを最小限に抑えて、均一なシーケンスのカバレッジを確保することがきわめて重要となります。これにより、最少量のトータルシーケンスからカバレッジ全体で最高の値が得られる効率的なシーケンシングが可能になります。KAPAライブラリー増幅キットは、バイアスを抑えて、次世代シーケンシングライブラリーを増幅するためのハイフィデリティー PCRキットです。

KAPAライブラリー増幅キットには、プライマーとテンプレートを除くPCRのすべてのコンポーネントを含む、すぐに利用できるカクテルのKAPA HiFi HotStart PCR ReadyMix (2X) が含まれています。この2X ReadyMixには、dNTPおよびMgCl₂ (1Xで2.5mM) などの専用反応バッファーにKAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼが含まれています。

KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼは、抗体ベースのホットスタート式のBファミリー DNAポリメラーゼです。ほかのハイフィデリティー (Bファミリー) DNAポリメラーゼならびにブレンドタイプのポリメラーゼに比べ、比類なき性能を示します。KAPA HiFi DNAポリメラーゼは、DNAに対する親和性を高めた設計で、補助タンパク質ドメインが不要です。酵素自体の高いプロセスビティは、難しいアンプリコンにおける増幅の収量、感度、速度、ターゲット長、および性能の大幅な向上につながります。この点を強化することで増幅バイアスが抑えられ、ひいてはシーケンスカバレッジの均一性が高まります。ホットスタート式の場合、最初の変性ステップまで専用の抗体がポリメラーゼを不活化します。これにより、反応のセットアップと開始時に非特異的なプライミングに起因する非特異増幅産物が除外され、全体的な反応効率が高まります。

KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼには、5' → 3' ポリメラーゼ活性および3' → 5' エキソヌクレアーゼ (ブルーフリーディング) 活性はありますが、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性はありません。この強力な3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性は、DNAの増幅中の高い正確性につながります。KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼでは、組み込まれたヌクレオチド3.6×10⁶あたりのエラー件数は1件です。このハイフィデリティーは、野生型*Taq*のハイフィデリティーの約100倍高く、その他のBファミリー DNAポリメラーゼおよびブレンドタイプのポリメラーゼより最高10倍高い値です。KAPA HiFi HotStart ReadyMixで生成されたDNAフラグメントは、制限酵素消化やシーケンスなどのルーチンのダウンストリームの分析またはアプリケーション用として使用することが可能です。KAPA HiFi HotStart ReadyMixで生成されたPCR産物は、平滑末端化されるため、TAクローニングベクターへのクローニングのためには、別途3' 末端にdA付加が必要となります。

2. アプリケーション

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) は、以下のとおり、複雑なゲノムライブラリーの増幅とターゲットキャプチャシーケンスのエンリッチに理想的です。

- 増幅バイアスの低減が求められる全ゲノムシーケンス
- ハイフィデリティーが求められる一塩基変異多型 (SNP) の同定

● 保存

−20℃で保存してください。

クイックノート

- KAPAライブラリー増幅キットには、高度な再現性とプロセスビティを誇る新規のKAPA HiFi DNAポリメラーゼが含まれています。
- KAPA HiFi HotStart ReadyMixは、比類なきフィデリティーを維持しつつ、増幅バイアスの影響を最小限に抑えるように特別に設計されています。
- 最適なサイクル数は、PCR反応に添加するライブラリー (アダプター結合、サイズ分画、精製済み) の濃度と容量により決定されます。通常は5-18サイクルですが、ワークフローによって最適化が必要となります。
- 表1にリストされたものと異なるカスタムメイドのプライマーを使用する場合、グラジエントPCRを実施してアニール温度を最適化することをおすすめします。
- キットは、Nextera™ Sample Preparationのプロトコールに対応しています。98℃の変性温度を使用してください。

KAPAライブラリー増幅キット

3. ライブラリー増幅プロトコール

1: 準備

- PCRのエンリッチに必要なプライマー（詳細は表1を参照）、KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) のチューブを室温で解凍します。
- KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) とプライマーのチューブを600xgで5秒間、遠心（スピンドアウン）します。
- アダプターが結合しサイズ分画され精製されたライブラリーDNAを解凍し、600xgで5秒間、遠心（スピンドアウン）します。
- イルミナライブラリーの具体的な設定については、表1に記載の推奨サイクリングプロトコールに従い、サーマルサイクラーを予めプログラムします。

2: 反応のセットアップ

ライブラリーの最適な多様性を維持するには、アダプターが結合した十分量のライブラリーDNAを各エンリッチPCR反応液に加える必要があります。最適なサイクル数は、PCR反応液50 μ Lあたりに加えられるライブラリーの容量と濃度によって決定します。実際のエンリッチPCRの実施前に、収量を最適化するためにPCRのタイトレーション（最適サイクルの確認）が必要となる可能性があります。

以下の分注操作を行う際には都度ピペットチップを交換してください。特定のライブラリー調製のプロトコールについて提案されている反応のセットアップは、表1をご覧ください。

- 25 μ L分のKAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)
- プライマーミックスまたは個々のプライマー
- 精製済みのアダプターが結合したライブラリーDNA
- PCRグレードの水で50 μ Lに調製します。
- 各反応液を密封し、静かに混和させ、600xgで5秒間遠心分離します。

3: サイクリングプロトコール

- 特定のライブラリーのサーマルサイクリングプロトコールについては、表1を参照してください。

4: PCRのクリーンアップ

- PCRによるエンリッチ後、Agencourt AMPure XPビーズ (Beckman Coulter Genomics製、製品番号 A63881) または Qiagen MinElute PCR精製キット (Qiagen製、製品番号 28004) のいずれかを使用して各反応液をクリーンアップします。

5: ライブラリーのバリデーション

- PCRエンリッチ後のフラグメントのサイズの検証にはゲル電気泳動法などで、サイズ分布を確認します。
- 適切なKAPAライブラリー定量キット (KK4824, KK4835, KK4844, KK4854) を使用し、正確に両末端にアダプターが結合した分子の数を定量します。増幅可能なライブラリー分子の正確な定量は、イルミナのシーケンシングのプラットフォームを有効に活用するうえで、きわめて重要です。ライブラリーの濃度の過大評価は、ブリッジPCR後のクラスターの密度の低下につながります。ライブラリーの濃度の過小評価はフローセル上に過剰なクラスターを形成し、クラスター解像度の低下につながる可能性があります。どちらの場合も、最適以下のシーケンシングのキャパシティに終わります。各ライブラリーの同等のデータを確保するために、マルチプレックスシーケンシング用のインデックス付きライブラリーを作製している場合は、正確なライブラリーの定量がプールミックスに重要です。

KAPAライブラリー増幅キット

3. ライブラリー増幅プロトコール (続き)

表 1. KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) 推奨条件

Type of Illumina Library	Reaction Setup			Cycling Protocol	
	Component	Final Conc.	Volume/50 µL rxn	Step	Duration and Temperature
Genomic DNA	PCR grade water		As needed	Denaturation	45 sec at 98 °C
	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Cycling*	15 sec at 98 °C 30 sec at 65 °C 30 sec at 72 °C
ChIP	PCR Primer 1.1	500 nM	1 µL		
	PCR Primer 2.1	500 nM	1 µL		
	Library DNA		As needed	Final Extension	1 min at 72 °C
PE	PCR grade water		As needed	Denaturation	45 sec at 98 °C
	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Cycling*	15 sec at 98 °C 30 sec at 65 °C 30 sec at 72 °C
	PE PCR Primer 1.0	500 nM	1 µL		
	PE PCR Primer 2.0	500 nM	1 µL		
	Library DNA		As needed	Final Extension	1 min at 72 °C
PE Multiplex	PCR grade water		As needed	Denaturation	45 sec at 98 °C
	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Cycling*	15 sec at 98 °C 30 sec at 65 °C 30 sec at 72 °C
	PE PCR Primer InPE 1.0	500 nM	1 µL		
	PE PCR Primer InPE 2.0	10 nM	1 µL		
	PCR Primer Index 1 - 12	500 nM	1 µL		
	Library DNA		As needed	Final Extension	1 min at 72 °C
GEX	PCR grade water		As needed	Denaturation	45 sec at 98 °C
	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Cycling*	15 sec at 98 °C 30 sec at 60 °C 15 sec at 72 °C
Small RNA	Primer GX1	500 nM	0.5 µL		
	Primer GX2	500 nM	0.5 µL		
	Library DNA		As needed	Final Extension	1 min at 72 °C
TruSeq DNA	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Denaturation	45 sec at 98 °C
	PCR Primer Cocktail (PPC)	500 nM each	5 µL	Cycling*	15 sec at 98 °C 30 sec at 60 °C 30 sec at 72 °C
TruSeq RNA	Library DNA		20 µL	Final Extension	1 min at 72 °C
Nextera™	2X KAPA HiFi HS RM	1X	25 µL	Initial Extension	3 min at 72 °C
	50X Nextera Primer Cocktail		5 µL	Denaturation	30 sec at 98 °C
	Index1 primer		5 µL	5 - 9 Cycles*	10 sec at 98 °C 30 sec at 63 °C 3 min at 72 °C
	Index1 primer		5 µL		
	Tagmented Library		10 µL	Hold	10 °C

* 最適なサイクル数は、PCR反応に添加するライブラリー（アダプタ結合、サイズ分画、精製済み）の濃度と容量により決定されます。通常は5-18サイクルですが、ワークフローによって最適化が必要となります。

●注意：本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。