

Technical Data

## KAPA EvoPlus Kit を用いた10 ngの HumanGenomeサンプルからのライブラリー調製

評価製品

KAPA EvoPlus Kit 24反応 (KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No. 09420037001)  
KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit  
(KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No. 08861919702)

目的

次世代シーケンス用ライブラリー調製Kit「KAPA EvoPlus Kit」を使用し、10 ngの精製済みサンプルから目的サイズのライブラリーが調製できるか検証を行った。

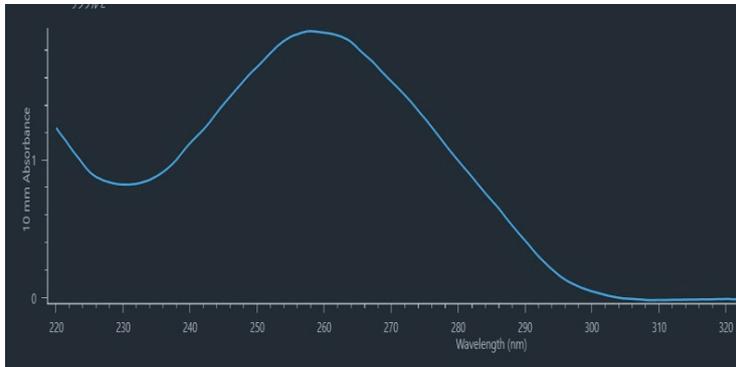
### 概要

KAPA EvoPlus KitはKAPA HyperPlus Kitの進化版として新しく発売されたKitです。本実験では10 ngからのHumanGenomeサンプル(精製済み)を用いて取説記載の断片化時間で目的サイズのライブラリーが調製できるか、またAmplificationのサイクル数の違いにおけるライブラリーの収量を検証しました。その結果、目的サイズの断片化ができ、シーケンスを行うために十分な量のライブラリーが得られた事例となります。

### 実験方法

- 使用DNA：精製済み Human genomic DNA 10 ng (CORIELL INSTITUTE, NA19240)  
NanoDropにてQuality Checkを行い、品質に問題がないDNAであることを確認した。(Qualityについては下記参照)

【NanoDrop スペクトル結果】



【NanoDrop 吸光度結果】

A260/A280	A260/A230	A260	A280
1.887	2.229	1.458	0.773

### 製品紹介

#### KAPA EvoPlus Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No. 09420037001)

- 一般的な酵素断片化Kitに比べ、アーティファクト(人工的な変異)の発生を低減
- インプットサンプル中に含まれるEDTAなど、インヒビターの影響による断片化サイズのばらつきを改善
- フラグメンテーションとAテーリングを統合した簡便なステップ
- 操作時間を短縮(おおよそ2時間)
- サンプルインプットレンジは10 ng~500 ng (PCRフリーライブラリーは75 ng以上から可能\*)
- プレートフォーマットタイプを新たに追加し、完全に自動化可能なワークフローでのご提供

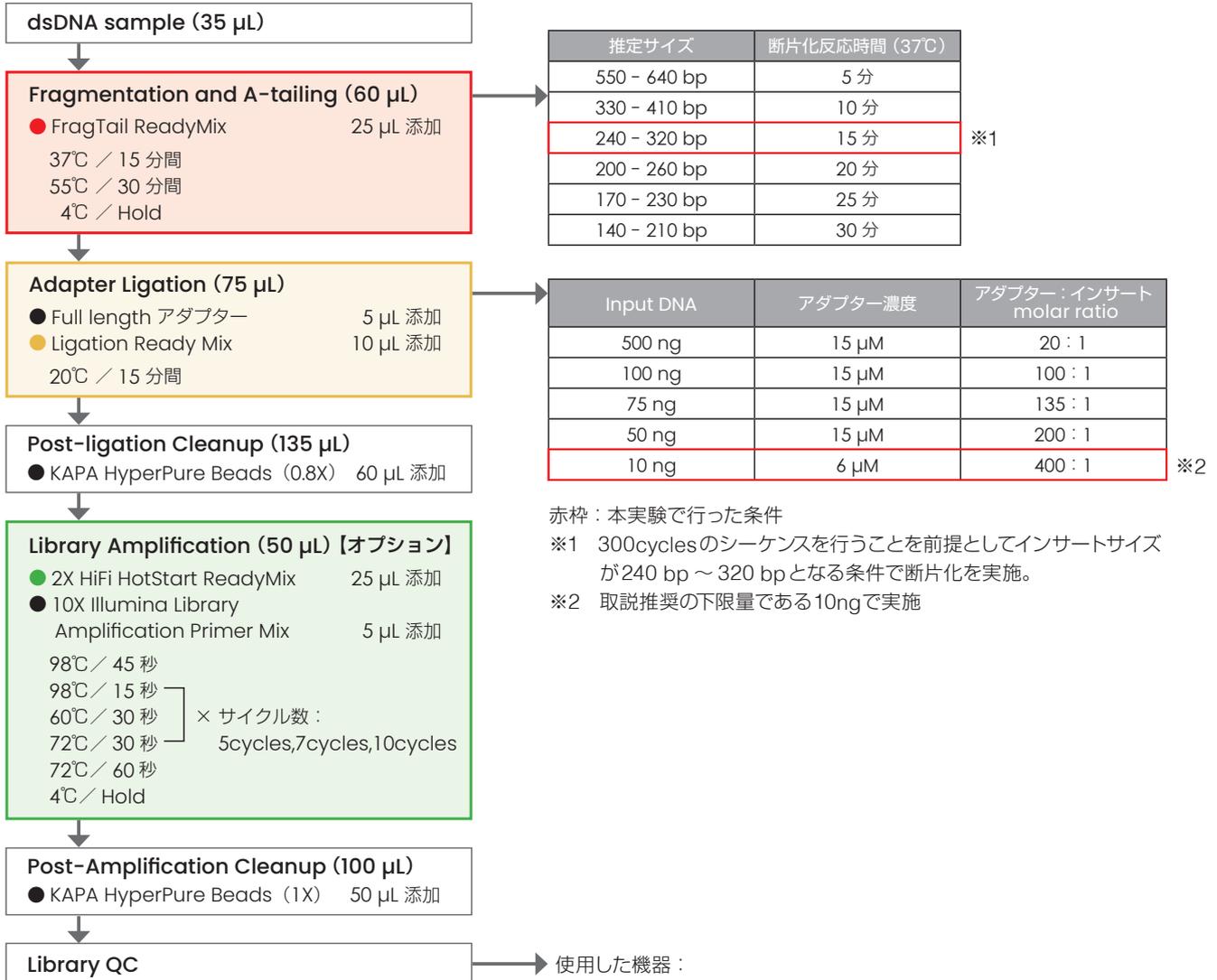


\* 全ゲノムシーケンス、高品質gDNA、ダブルサイズセレクションをしていない、フルレンジアダプターを使用する、などの条件を満たす必要があります。

## ライブラリー調製のワークフロー

### 〈本実験での実施条件〉

- 断片化条件 : 37°C 15分 (インサートサイズ 240 bp~320 bpに設定)
- アダプター濃度 : 6 µM (モル比 アダプター:インサート = 400:1) ※Stock conc.をdilution Bufferにて希釈して使用
- Amplification PCR cycle : 5 cycles, 7 cycles, 10 cycles



赤枠 : 本実験で行った条件

※1 300cyclesのシーケンスを行うことを前提としてインサートサイズが240 bp ~ 320 bpとなる条件で断片化を実施。

※2 取説推奨の下限量である10ngで実施

使用した機器 :

Agilent 2100 バイオアナライザ 電気泳動システム  
(アジレント・テクノロジー株式会社)  
LightCycler® 96 System  
(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

使用した試薬 :

High Sensitivity DNA Kit  
(アジレント・テクノロジー株式会社, Cat.No. 5067-4626)  
KAPA LibraryQuantification Kit 500回用 illumina universal  
(KAPA BIO SYSTEM 社, Cat.No. 07960140001)

## 評価方法

### 1. ライブラリーサイズ

Post-Amplification Cleanup後のライブラリーを、RNA Free水にて10倍希釈した。その後、Bioanalyzerにてサイズ測定し、正しいサイズで断片化されていることを確認した。

### 2. ライブラリー収量

ライブラリー収量は、qPCRにて濃度測定を行い、シーケンスのRunに十分な濃度であることを確認した。

## 結果

ライブラリー濃度の目安：4 nM (illuminaシーケンサーのライブラリーインプット濃度)

サイクル数	5 cycles	7 cycles	10 cycles
ライブラリーサイズ	376 bp*	371 bp*	361 bp*
濃度 (nM)	16.80 nM	61.75 nM	347.61 nM

\*ライブラリーサイズはアダプター (約 130 bp) を含めたライブラリーの平均サイズで算出した。

### まとめ

- アダプター (約 130 bp) を含めたライブラリーサイズは 370 bp 付近となったことから15分のFragmentationにおいてほぼ取説推奨通り 240 bp のインサートサイズを得る事ができた。
- Clean up 後、アダプターダイマーは見られなかった。このため、アダプターのインプット比率も問題ないことが確認できた。
- 5 cycles でシーケンスに必要なライブラリー量 (4 nM) を得る事ができた。

### 結論\*

10 ng の HumanGenome サンプル (精製済み) から KAPA EvoPlus Kit を用いて、取説通りの操作方法で目的サイズのライブラリー調製を行う事が可能であった。

また、最少サイクルでシーケンスに必要な量のライブラリー量を得る事ができた。

\* サンプルの状態によっては事前の検討が必要となる場合がございます。