

Kapa Biosystems

次世代型シーケンスライブラリー定量キット



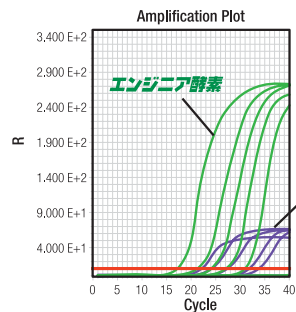
以下の機器（シーケンサー）に使用できます

- ・ Illumina Genome Analyzer（イルミナ）
- ・ Roche 454 GS Titanium and FLX（ロッシュ）
- ・ ABI SOLiD（アプライドバイオシステムズ）

Kapa Biosystems社における全く新しい“エンジニア酵素”の開発

選別されて残った全く新しい“エンジニア酵素”を製品として採用

例：高濃度のSYBRGreenIを含むPCR反応溶液中でも卓越した増幅を示す全く新しい“エンジニア酵素”が開発されました。



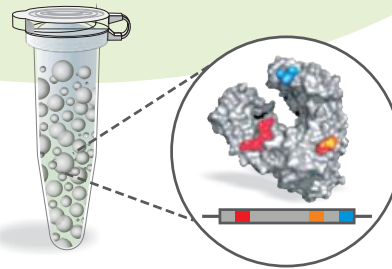
4

全く新しい“エンジニア酵素” (Engineered enzymes) を開発

独自の特許技術により、ベースとなる野生型酵素 (Taq DNA ポリメラーゼなど) から、おおよそ1億種類もの変異株ライブラリーを作り出し、そこから自然界に存在しない全く新しい“エンジニア酵素” (Engineered enzymes) を開発することが可能となりました。「伸長スピードが速い」「PCR阻害物質に強い」などの新しい特長を持つ“エンジニア酵素”を採用した新しい製品をリリースしています。

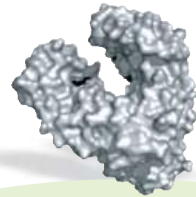
わずか One tube内で、各変異体を別々の“エマルジョン”中に発現させ、条件に適したクローンのみが残るようにハイスループットスクリーニングを実施
例：PCR阻害物質であるSYBRGreenIを高濃度に添加してスクリーニングをすると、...

3



1

野生型酵素
例：Taq DNAポリメラーゼ



2

ランダムに突然変異を起こし、おおよそ1億種類もの変異株ライブラリーを作成

次世代型シーケンスライブラリーの定量化

迅速で費用効率が高く且つ信頼性の高いライブラリーDNAの定量は、次世代型シーケンス(遺伝子解析)プラットフォームの効率の良いハイスループット化にあたって大きな障害となっています。

これらのプラットフォームを最も効率良く使用するためには、ビーズ上やフローセル上のDNA断片が増幅に最適な比率になるようにem PCR (Roche 454、ABI SOLiD) やBridge PCR (Illumina GA) を行わなければなりません。

1. ライブラリーサイズの過大評価は、ゲノムの読み取り不足やカバーする範囲の縮小を起こす恐れがあります。
2. ライブラリーサイズの過小評価は、ビーズ毎のクラスターが多過ぎたりテンプレートが複数存在したりして、結果的に質の悪いデータとなってしまう恐れがあります。

emPCR やbridge PCRを行う前のライブラリーDNAの正確な定量は、高品質(高精度)なシーケンス・データを得る為の最も重要なステップであり、そのコストとスループットに密接な係わりを持っています。

一般的なNGS(Next-Generation Sequencing)ライブラリー定量方法

	UV 分光光度計測定	核酸蛍光染色法	電気泳動法
例	NanoDrop	RiboGreen, PicoGreen	BioAnalyzer, Experion
リニアダイナミックレンジ	5ng/μL - 3μg/μL	2.5pg/μL - 1ng/μL (ssDNA) 0.025pg/μL - 1ng/μL (dsDNA)	<ul style="list-style-type: none"> 検出限界 200pg/μL (アジレント High Sensitivity DNA Kit) ssDNAの検出限界 25?500ng/μL (RNA 6000 Nano Total RNA Kit)
メリット デメリット	個々のサンプルを迅速、簡便に測定できる。マニュアルでサンプルロードが必要。感度が乏しい。	UV分光光度計測定や電気泳動法より感度が優れる。96ウェルプレートで測定できる。必要サンプル容量が多い。	平均ライブラリーサイズ情報も提供される。コストが高価で、ハイスループットにも向かない。

* これらの手法はいずれも感度に乏しく、シーケンスに必要とされているDNA量の1000倍以上を定量しなければなりません。

* これらのいずれの手法も、ライブラリーサンプルの中の増幅可能な分子の数を提供することは出来ません。

(Libraries contain DNA without adaptors, dNTPs, 等々)

一般的なNGS(Next-Generation Sequencing)ライブラリー定量方法

ライブラリーDNAの定量にq PCRを用いることで、2つの重要なメリットが得られます；

1. q PCRのみが、「増幅可能な」分子を定量することができます。したがって、emPCRやクラスター増幅に最適な量のライブラリー量を決定することができます。
2. q PCRのみが、「希薄なライブラリー」を正確に定量することができます。これは、遺伝学的材料が限定されている場合や、ライブラリー増幅を最低限に抑制することが要求される場合に、特に有用です。

q PCRはライブラリー定量のゴールドスタンダードです

[Titration-free massively parallel pyrosequencing using trace amounts of starting material.](#)

Zheng et al. Nucleic Acids Res. 2010 Apr 30.

[Rapid quantification of DNA libraries for next-generation sequencing.](#)

Buehler et al. Methods. 2010 Apr;50(4):S15-8.

[A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready barcoded libraries for 454.](#)

Lennon et al. Genome Biol. 2010;11(2):R15.

[Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of \(G+C\)-biased genomes.](#)

Kozarewa et al. Nat Methods. 2009 Apr;6(4):291-5.

[A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system.](#)

Quail et al. Nat Methods. 2008 Dec;5(12):1005-10.

[From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing.](#)

Meyer et al. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(1):e5.

リアルタイムPCR とNGSライブラリーの定量

qPCR法の潜在的な限界：

1. qPCRキットは、SYBRGreen蛍光試薬によって阻害される野生型Taq DNA ポリメラーゼを含んでいる
 - ・より長いアンプリコン (> 400 bp) を増幅すると、増幅効率が落ちる
 - ・高い構造化アンプリコン (例：GC含量やAT含量が高い) を増幅すると、増幅効率が落ちる
2. 自家調製したDNAスタンダードでは、調製に時間がかかり、QC (品質の管理) やロット間の一貫性維持が困難となる。

qPCRの欠点は、KAPAライブラリー定量キットを使用することで打破されます！

KAPA ライブラリー定量キットの構成

ロッシュ454 Titanium 及びFLX, イルミナGA, ABI SOLiD 用



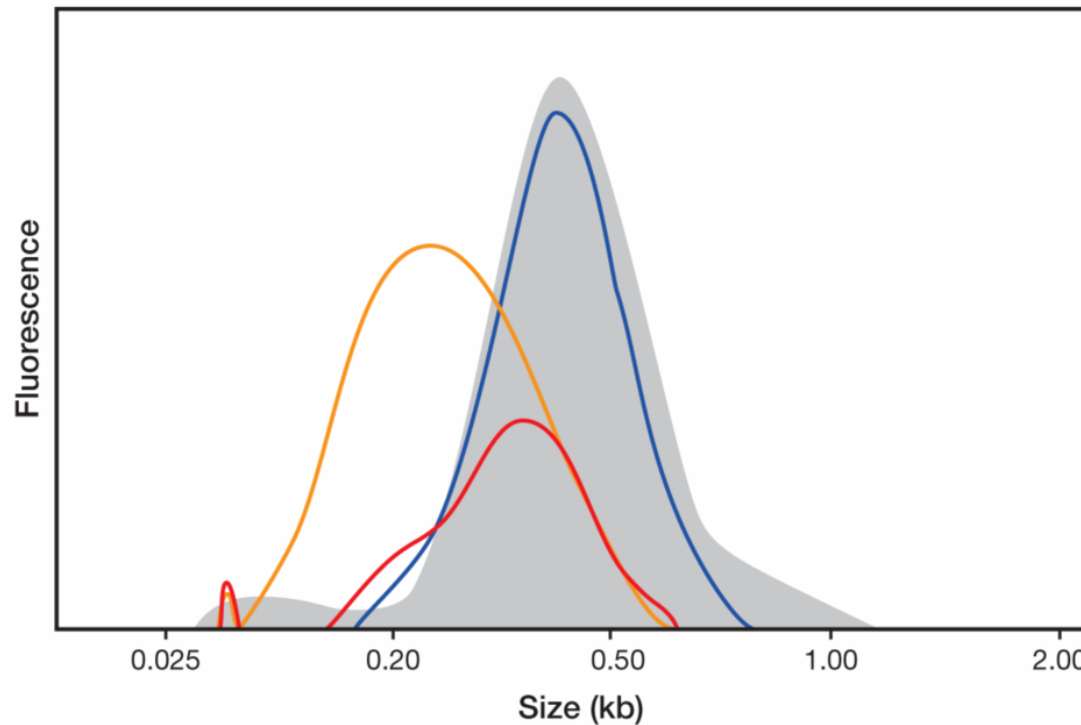
構成品目:

- ・ 5 mL KAPA SYBRR FAST qPCR キット (各社のqPCR装置専用)
- ・ 1 mL プライマープレミックス (各社のNGS装置専用)
- ・ 6 × 80 μ L スタンダードDNA (各社のNGS装置専用)

- ・ スタンダードDNAの仕様 (ブロードレンジをカバーします)
 - ・ 20 pM ~ 0.0002 dsDNA (イルミナGA用452 bp スタンダード) 或いは
 - ・ 100,000,000 ~ 1,000 ssDNA copies / μ L
(ロッシュ454 GS FLX用486 bp スタンダード, ロッシュ454 GS Titanium用460 bp スタンダード, ABI SOLiD用150 bp スタンダード)
- ・ 有効期限(Shelf life) 及び凍結-融解試験済み
- ・ ロット間の一貫性

KAPA SYBRR FAST qPCRマスターミックスを用いた正確な定量

～長いテンプレートもバイアス(偏向)なく定量～



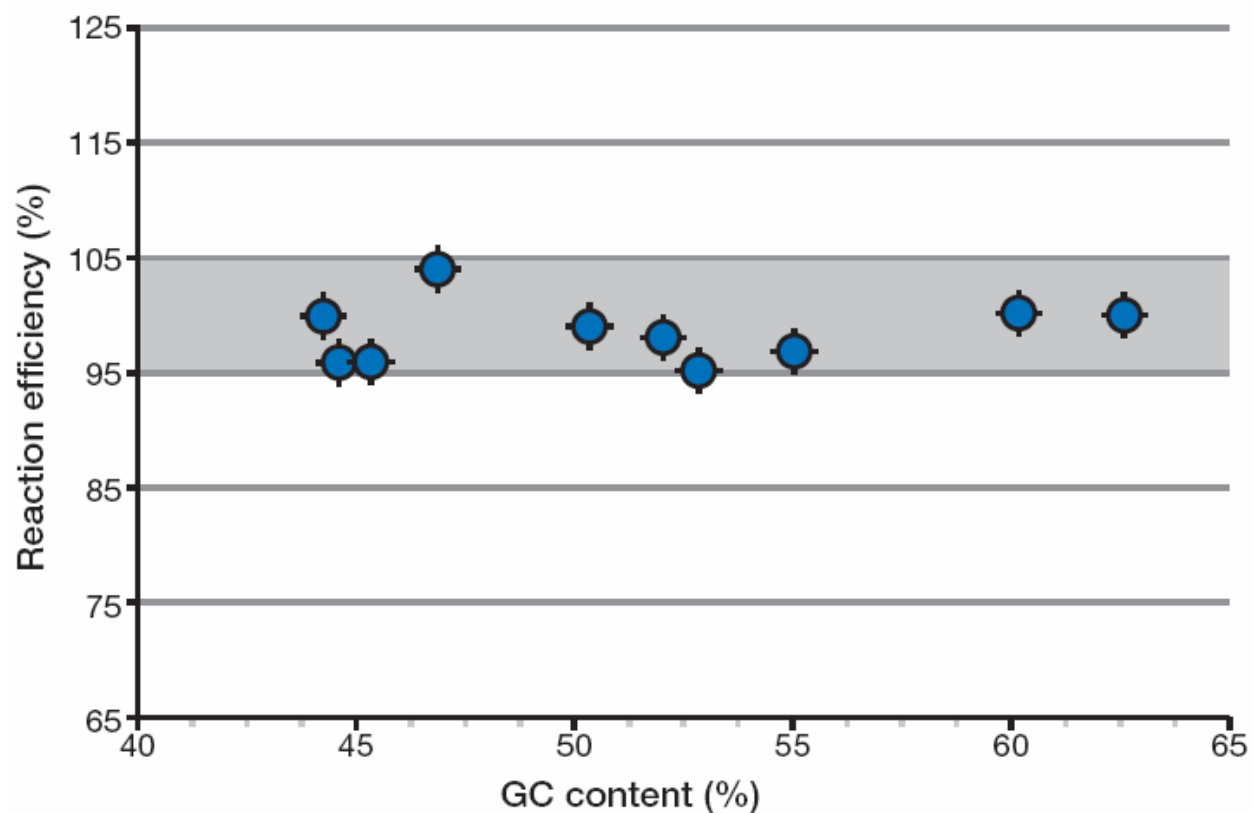
qPCR 前と後でのフラグメントのサイズ分布比較。qPCR 前は灰色で塗りつぶされた部分。

曲線グラフは各社のqPCRマスターミックスを用いて増幅させた後の分布を示しています。

青がKAPA SYBRR FAST, 赤はAg社キット, オレンジはFi社キット, 使用したqPCR装置はStratagene MX4000

反応条件：95 10分, 40サイクル×(95 10秒, 60 45秒)

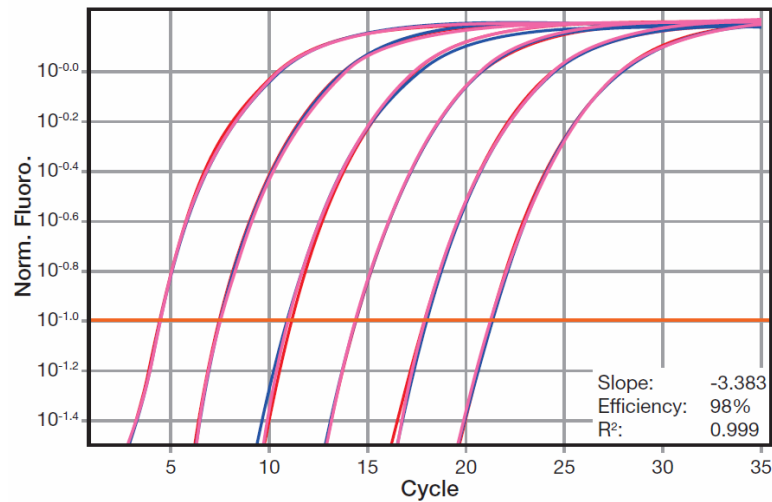
KAPA SYBRR FAST qPCR Master Mixの使用によるGC含量でバイアスが掛かることがない正確な定量



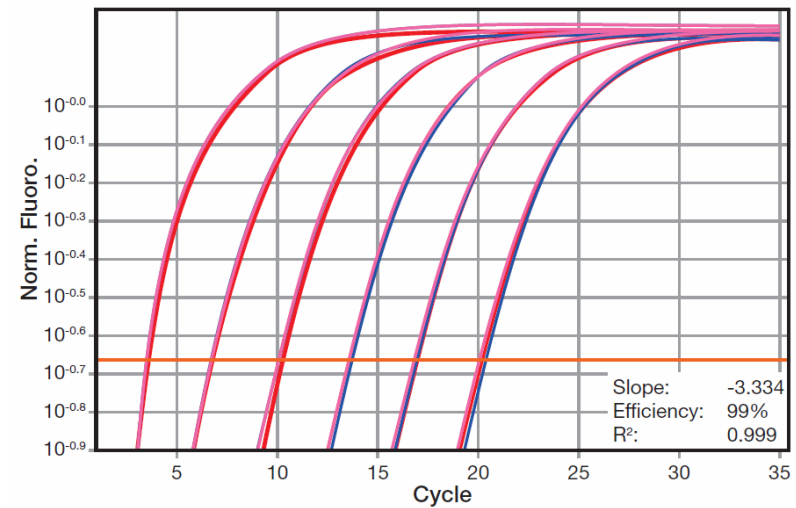
Kapa ライブラリー定量キット

～ 最小のロット間差 ～

A : イルミナ GA



B : ロッシュ454 GS Titanium

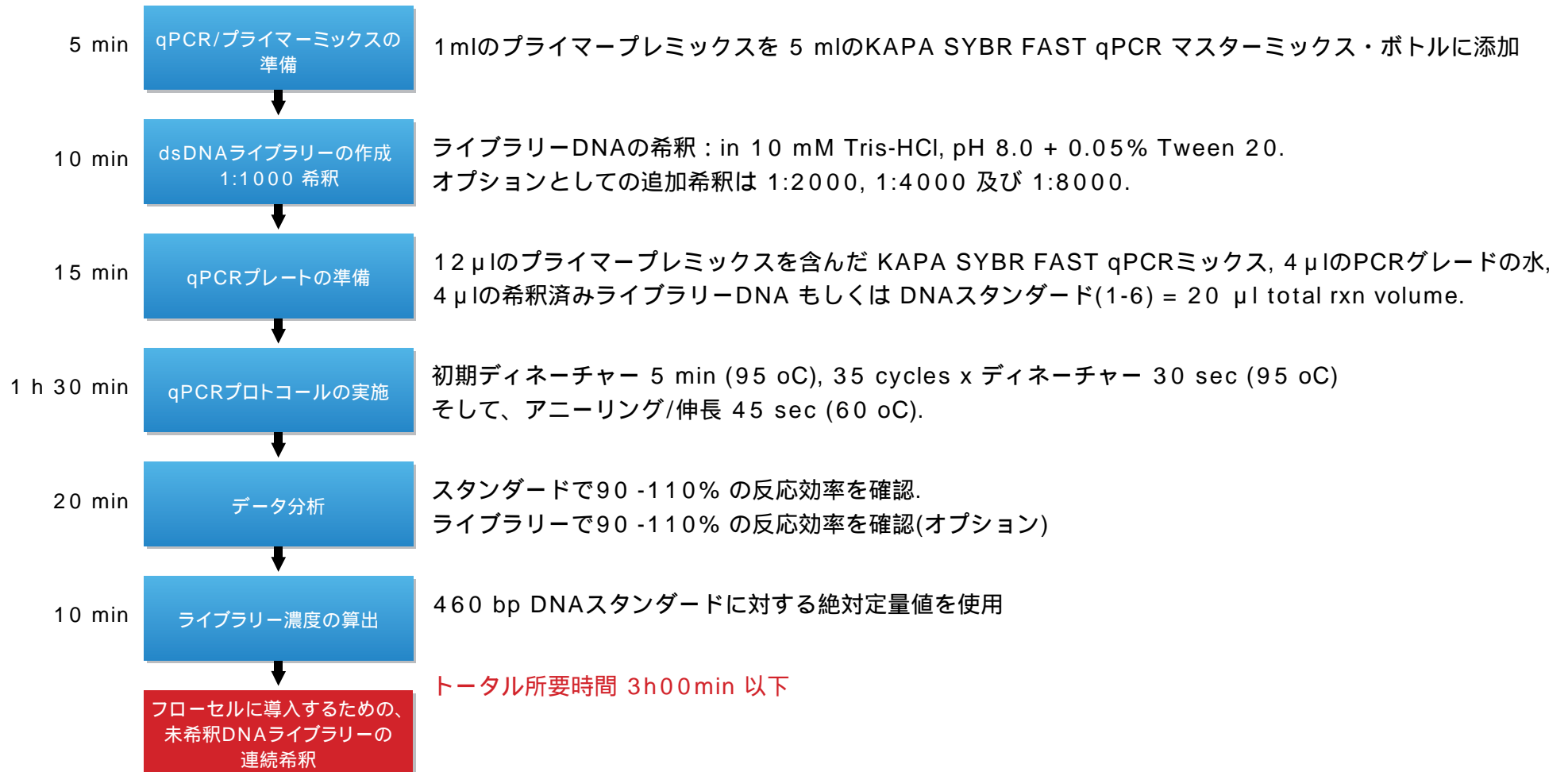


ロット間差をグラフに示しました。 A: イルミナGA ライブラリー定量キット. Lot 46775 (ピンク), lot 46782 (赤), lot 46789 (青), B: ロッシュ454 GS Titanium 定量キット. Lot 46723 (pink), lot 46725 (赤), lot 46727 (青) データは各ロットで三回の測定を行い平均値を示したものです。

KAPAライブラリー定量キットのDNAスタンダード

454 (ssDNA copies/ μ L)	Illumina (pM)	SOLiD (pg/ μ L)
50 000 000	20	10
5 000 000	2	1
500 000	0.2	0.1
50 000	0.02	0.01
5 000	0.002	0.001
500	0.0002	0.0001
486 bp (FLX) 459 bp (Titanium)	452 bp	154 bp

イルミナGA用 qPCRによるライブラリー定量のワークフロー

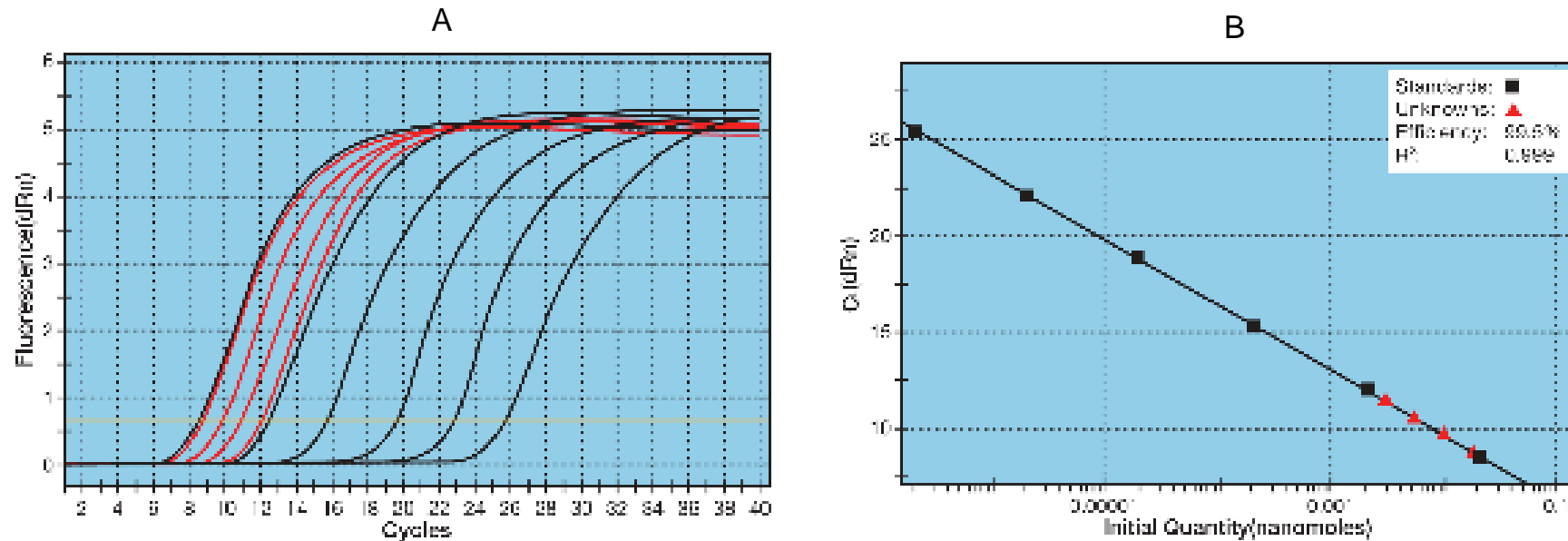


ケーススタディ 1: U.S. Genome Center 1 における KAPAライブラリー定量キットの結果

- ・ ヒト型結核菌(GC = 65%)ゲノムDNA がスタンダードイルミナライブラリープロトコールに従って準備されました。
- ・ 増幅されたライブラリーから切り取られた試料を使ったアガロースゲル法により、フラグメントの長さは平均値(275 bp)と決定されました。
- ・ フローセル上での最適なクラスター密度を得るために最適なライブラリーの濃度を決定するために、イルミナGAプラットフォーム用KAPA ライブラリー定量キットが使用されました。

断片化されたヒト型結核菌ライブラリーは1:1000で希釈されました(1 μ L ライブラリーを999 μ Lの希釈バッファーに添加)。その後、3回にわたり2倍希釈を繰り返し(100 μ L 希釈済みライブラリーを100 μ Lの希釈バッファーに添加)、次の希釈倍率を作成しました。1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000。これらの希釈サンプルはKAPAライブラリー定量キットに含まれている6種類のDNAスタンダードに対して使用されました。

qPCR 定量のアウトプット



A: リニアな増幅：赤のグラフが4種類のヒト型結核菌ライブラリー希釈サンプル(1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000)、黒のグラフが6種類のDNAスタンダード(20 pM, 2 pM, 0.2 pM, 0.02 pM, 0.002 pM, 0.0002 pM)

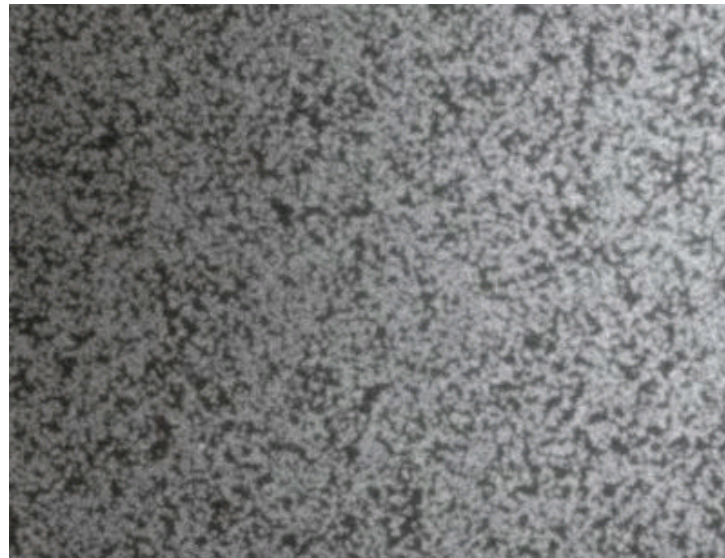
B: 算出されたqPCR効率のスタンダード・カーブとDNAスタンダードのデータ。赤の三角はライブラリー希釈サンプルでのCt値を示しています。

注記:

- ・ 10倍毎に濃度の異なる6種類のスタンダードは、3.3サイクルの一定のスペースで99.5%のqPCR効率となりました。
- ・ 2倍希釈を繰り返した4種類のライブラリーサンプルは、約1サイクルの一定のスペースで90-110%のqPCR効率となりました。
- ・ 全ての4種類のライブラリー希釈サンプルが、スタンダードのダイナミックレンジ直線上に乗っています。

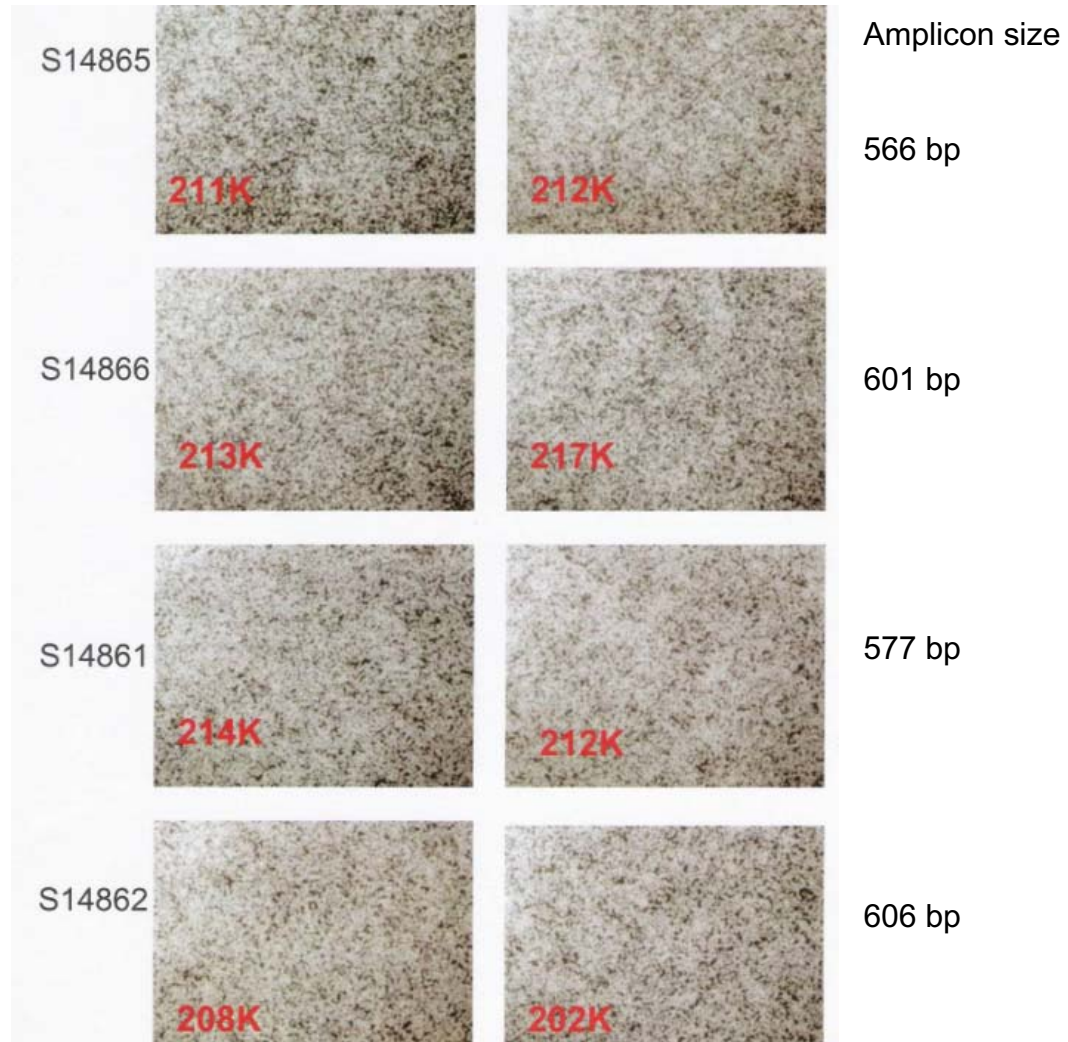
クラスター増幅結果

ライブラリーは10nMまで希釈され、クラスター増幅プロセスのために4.5pM がフローセル上に乗せられました。

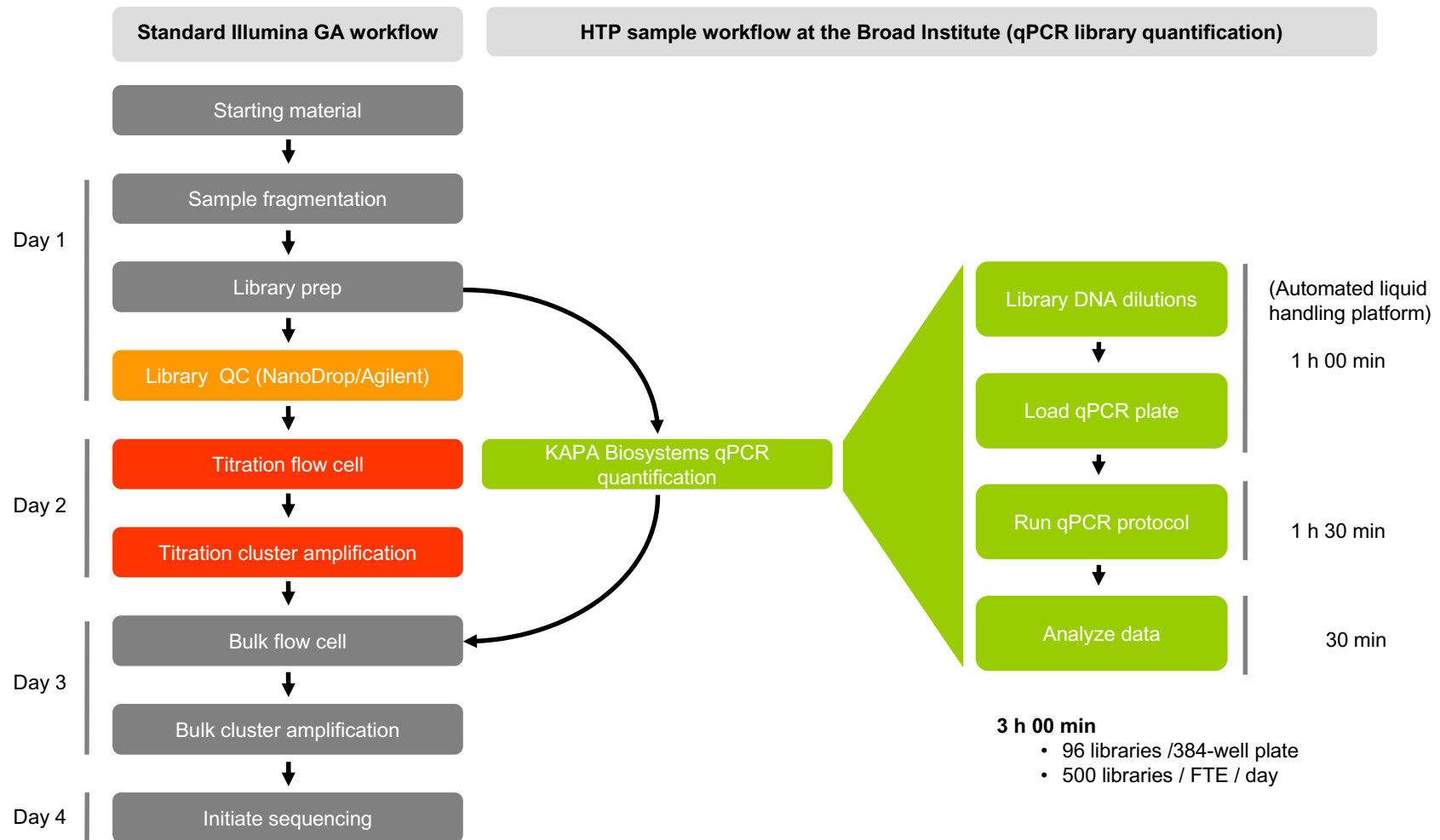


算出されたクラスター数値 = ~ 200,000

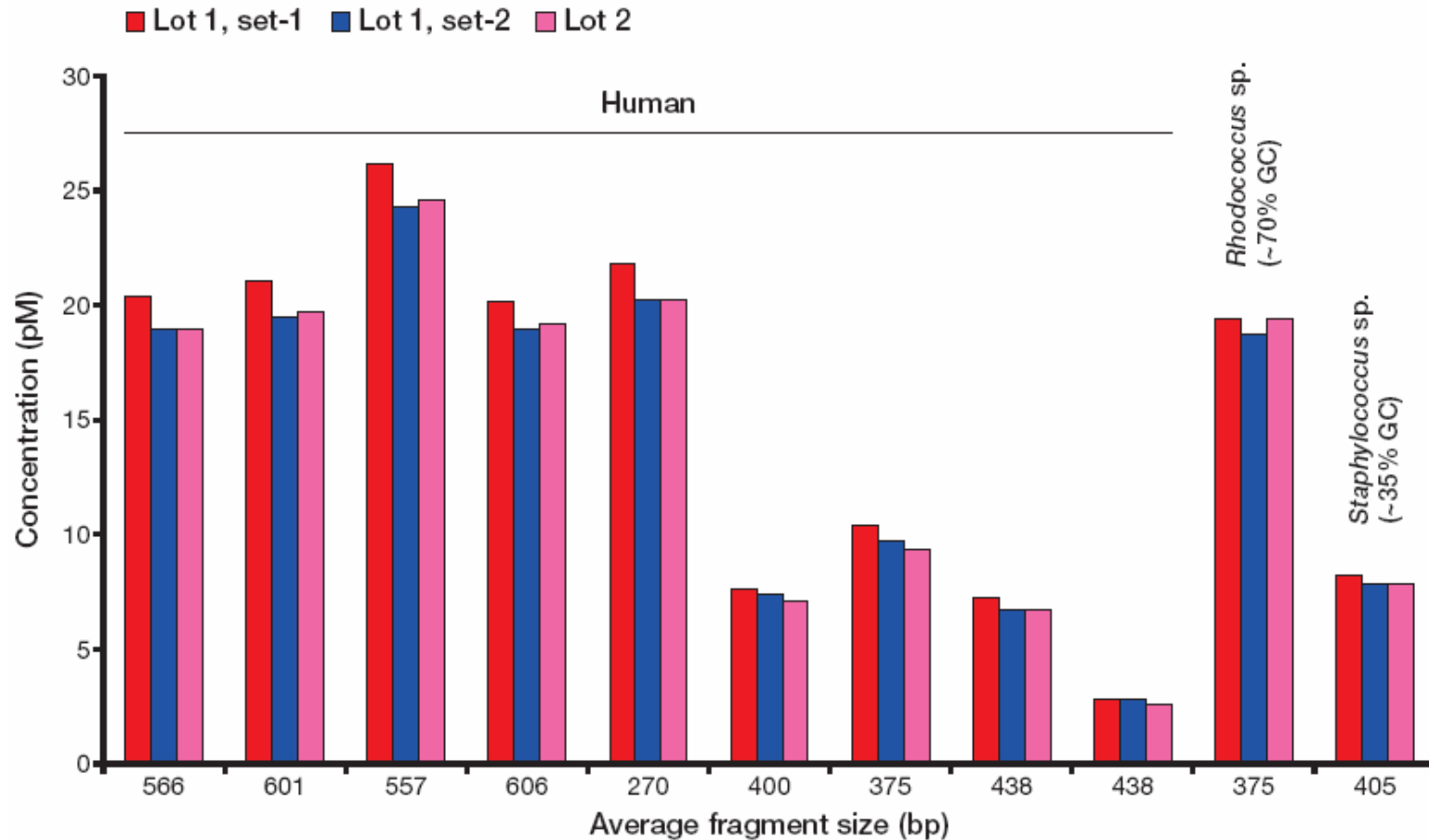
qPCR定量によるクラスター密度



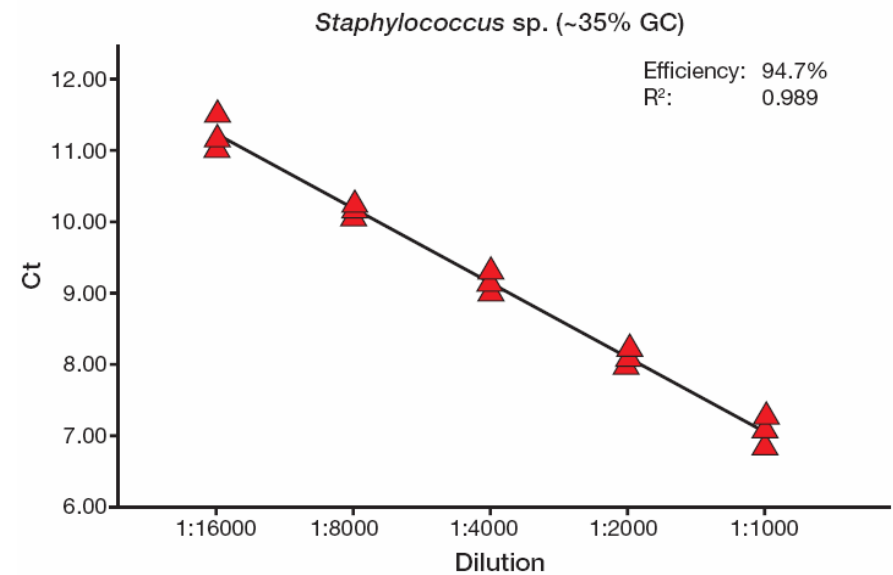
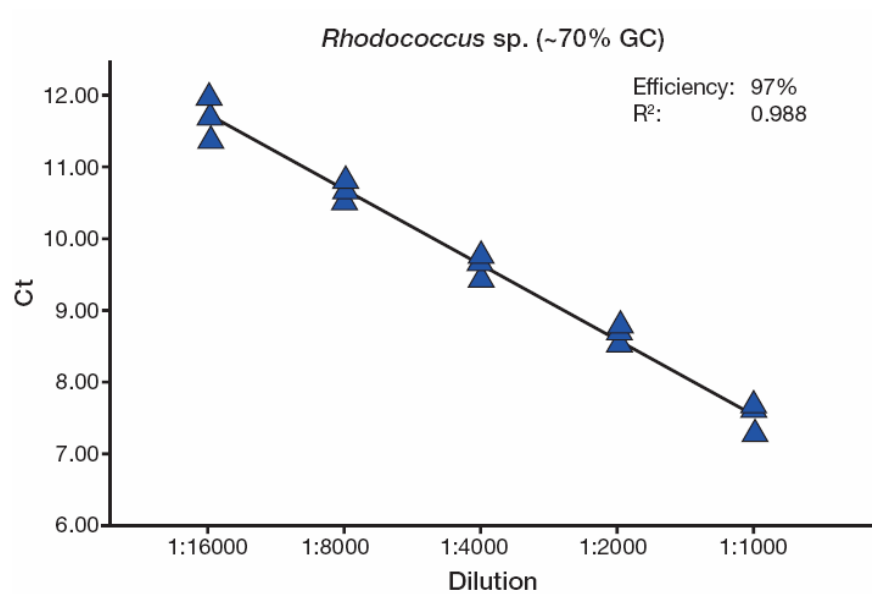
ケーススタディ2：ブロード研究所でのKAPAライブラリー定量キットの実施例



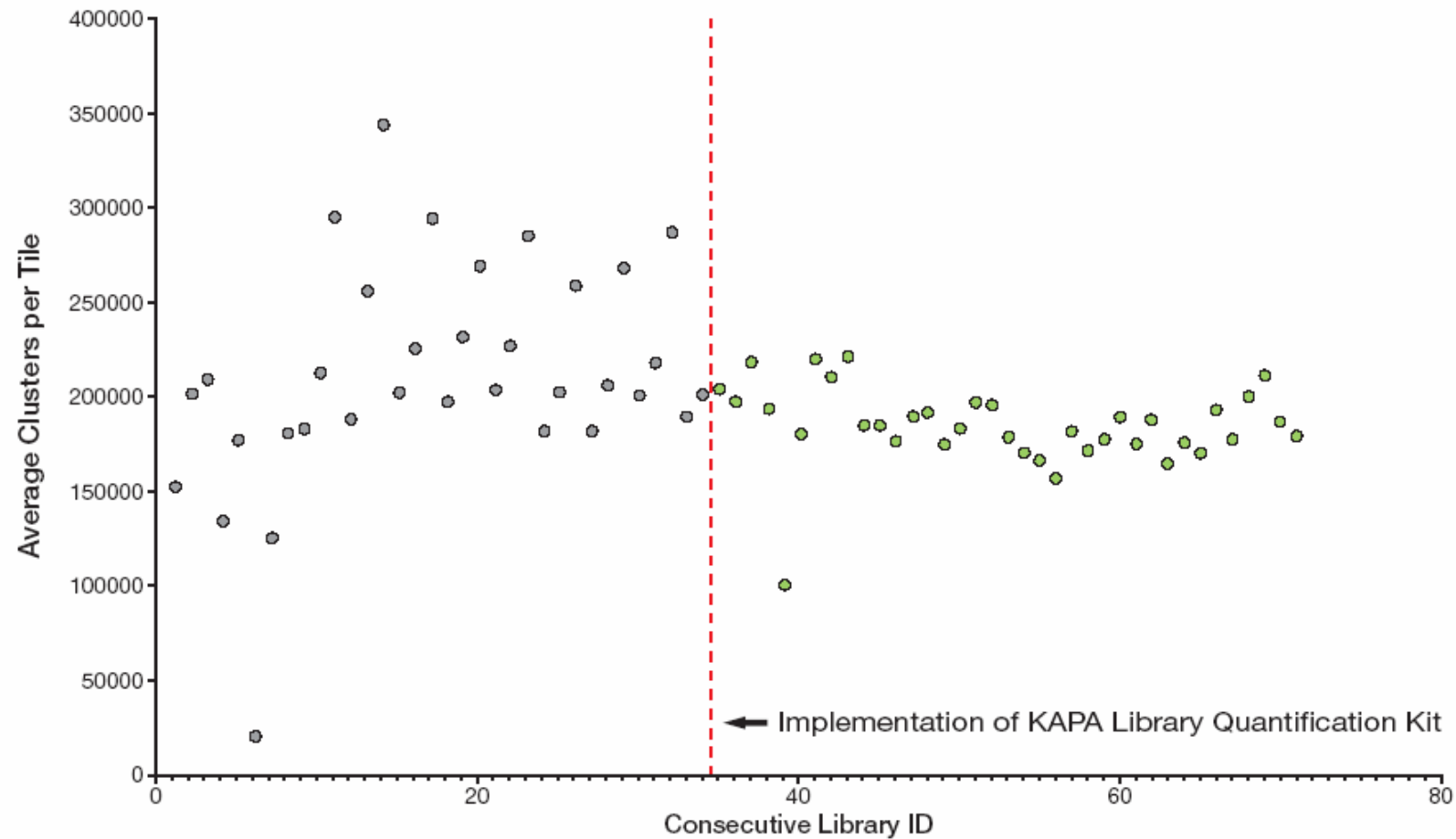
ブロード研究所でのKAPAライブラリー定量キットのロット間差



ブロード研究所での低～高GC含量ライブラリーの正確な定量



ブロード研究所でのKAPAライブラリー定量キット導入前後の クラスター密度



pPCRによるライブラリー定量が低濃度ライブラリーのシーケンスを可能とする

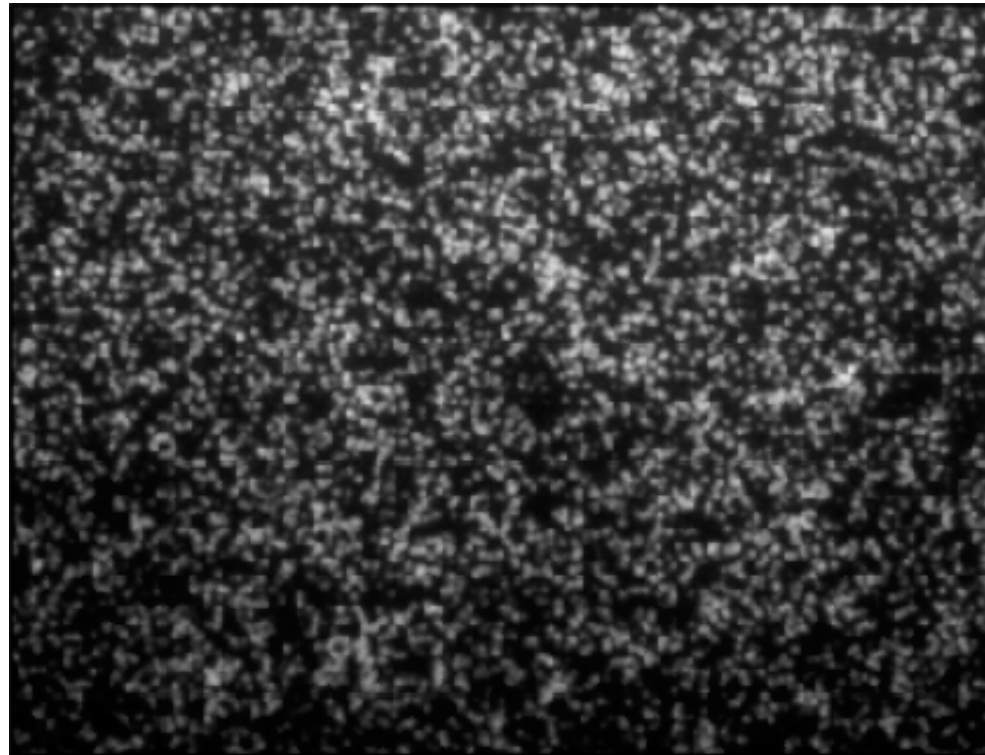


Fig.3 低濃度ライブラリーのクラスター画像
0.3 nMのライブラリーを正確にpPCRで定量することにより、1タイルあたり
~140,000クラスター、~900MBを生成することが可能となった。

まとめ

KAPAライブラリー定量キットを用いたqPCRは、ライブラリー定量の代替方法であり、他の方法に固有の問題点を克服することができます。

- qPCRは、増幅可能な分子のみを真に定量します
- 必要とされるサンプル量は少量のため、極めて幅広いダイナミックレンジに渡り正確に定量できます
- 標準的な自動分注装置によりハイスループット化が可能です
- KAPA SYBRR FAST qPCRキットは、高い反応効率でより長いテンプレートや複雑なライブラリー（GCリッチやATリッチ）でも増幅します
- 高速のKAPA SYBRR FAST qPCRキットが、サイクル時間を1時間30分以下に短縮します
- それぞれのNGSプラットフォーム用のDNAスタンダードが、安定した最低限のロット間差を示します

品質管理されたDNA定量用スタンダードと、無類の性能を持つKAPA SYBRR FAST qPCRキットが組み合わせられたKAPAライブラリー定量キットは、DNAライブラリー中の増幅可能な分子を定量するための、迅速、高感度で、信頼性が高い方法です。

>> Next-Generation PCR

Kapa Biosystems' molecular evolution platform is capable of engineering novel DNA polymerases that are fundamentally different at the protein level than wild-type Taq; our engineered DNA polymerases contain unique amino acid modifications that confer dramatic improvements to the performance of the enzyme.



KAPA2G™ Robust HotStart

Improve PCR success rates with this highly versatile second-generation polymerase. KAPA2G Robust DNA Polymerase offers higher processivity and specific activity, which translates to robust performance across a wide range of GC- and AT-rich templates and amplicons, difficult samples, as well as improved tolerance to many common PCR inhibitors such as ethanol, salt, and SDS. KAPA2G Robust HotStart is the enzyme of choice for crude samples, including veterinary PCR.



KAPA SYBR® FAST qPCR Kits

The first DNA polymerase engineered for real-time PCR.

KAPA SYBR® FAST DNA Polymerase has been evolved to perform optimally in stringent qPCR reaction conditions, exhibiting significant improvements in signal-to-noise ratio, cycle threshold (Ct), linearity, speed, and sensitivity. Kits are available for all qPCR instruments, including the Roche LightCycler 480.



KAPA PROBE FAST qPCR Kits

Precise, reproducible, and versatile kit for all probe-based qPCR applications.

Kits contain a ready-to-use master mix for highly sensitive and accurate real-time PCR using sequence-specific probe chemistries including TaqMan, FRET probes, and molecular beacons. Optimized for versatility and speed—KAPA PROBE FAST qPCR Kits provide fast and reproducible results for genotyping, gene expression analysis, and multiplexing.



KAPA HI-FI™ HotStart

World's highest fidelity polymerase for PCR—100x increase in fidelity over Taq.

KAPA HI-FI HotStart is a novel, single-enzyme system that exhibits industry-leading performance when compared with other high fidelity polymerases and polymerase blends. The intrinsic high processivity of KAPA HI-FI HotStart results in significant improvements in yield, sensitivity, speed, target length, and the ability to amplify difficult templates.



KAPA2G™ Fast HotStart

The ultimate hot start enzyme for extreme speed and performance.

Evolved specifically for speed and high performance, KAPA2G Fast HotStart offers Fast PCR based on the intrinsic ability of the KAPA2G Fast DNA polymerase to synthesize DNA at a much faster rate than wild-type polymerases. 1 second per kilobase extension rate allows for increased productivity and faster time to results without sacrificing performance.



KAPA Long Range HotStart

Engineered for long templates and extreme sensitivity.

The KAPA Long Range system is engineered for the amplification of long and complex targets up to 20 kb. The system is optimized specifically for high yields and extreme sensitivity. KAPA Long Range also exhibits a 4x improvement in fidelity as compared to standard Taq DNA polymerases.



KAPA Blood PCR Mix

Eliminate DNA extraction with the first polymerase engineered for PCR direct from blood.

The enzyme is supplied in an easy-to-use ready-to-go format containing all PCR components (except primers and template). KAPA Blood PCR Mix is ideal for multiplex PCR using one or more primer sets, real-time PCR followed by direct methylation enzyme digestion specific for SNPs, and paternity testing using the Promega PowerPlex® 11 System.