



Technical Data

KAPA Universal Adapter & UDI Primer Mixes を用いたライブラリ調製ワークフロー

評価製品

KAPA Universal Adapter
(Cat.No. 9063781001)
KAPA Unique Dual Index Primer Mixes
(Cat.No. 9134336001)
KAPA HyperPlus Kit (for illumina)
(Cat.No. KK8510/KK8512/KK8514)



メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

目的

KAPA Universal Adapter & UDI Primer MixesとKAPA HyperPlus Kitの組み合わせでライブラリー調製が可能かを検証する。

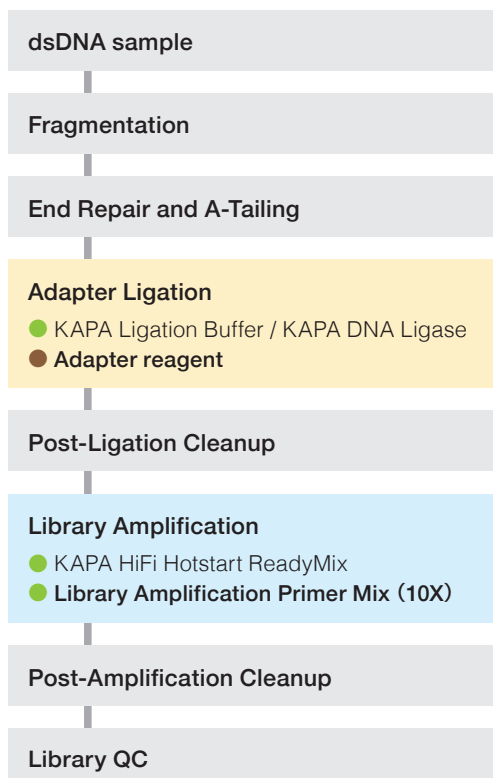
概要

NGSのライブラリー調製において、アダプター試薬はライゲーションベースかPCRベースの試薬が使用される。KAPA Universal Adapter、KAPA Unique Dual Index Primer Mixesは、ターゲットエンリッチメントのプロトコル (KAPA HyperCap Workflow v3.0) で使用されるPCRベースのアダプター試薬である。これまでに、本アダプター試薬をKapa Hyper Plus Kitのプロトコルに則ってKAPA Universal Adapter、KAPA Unique Dual Index Primer Mixesを使用した事例はありません。

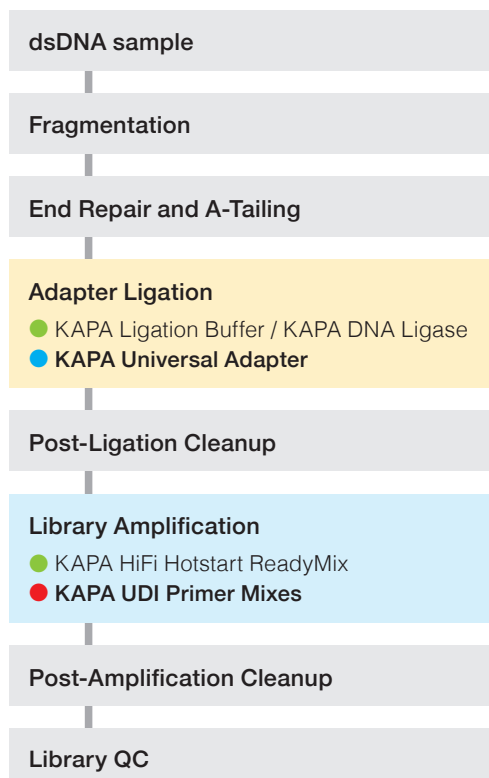
本テクニカルノートでは、このPCRベースのアダプター試薬をKAPA Hyper Plus Kitのプロトコルに適応し、ライブラリー調製が可能か実験を行った。その結果、シーケンスを行うのに十分量のライブラリーを確保する事ができ、KAPA Hyper Plus Kitのプロトコルでも使用できることを確認できた。

実験方法

KAPA Hyper Plus Kit ワークフロー (従来のワークフロー)



KAPA Hyper Plus Kit + KAPA Universal Adapter & UDI Primer Mixes ワークフロー



この2工程で使用する試薬が、従来のフローとは異なります。

- KAPA Hyper Plus Kit
- Adapter reagent
- KAPA Universal Adapter
- KAPA UDI Primer Mixes

左記ワークフローの●は、どのキットのコンポーネントであるかを示しています。

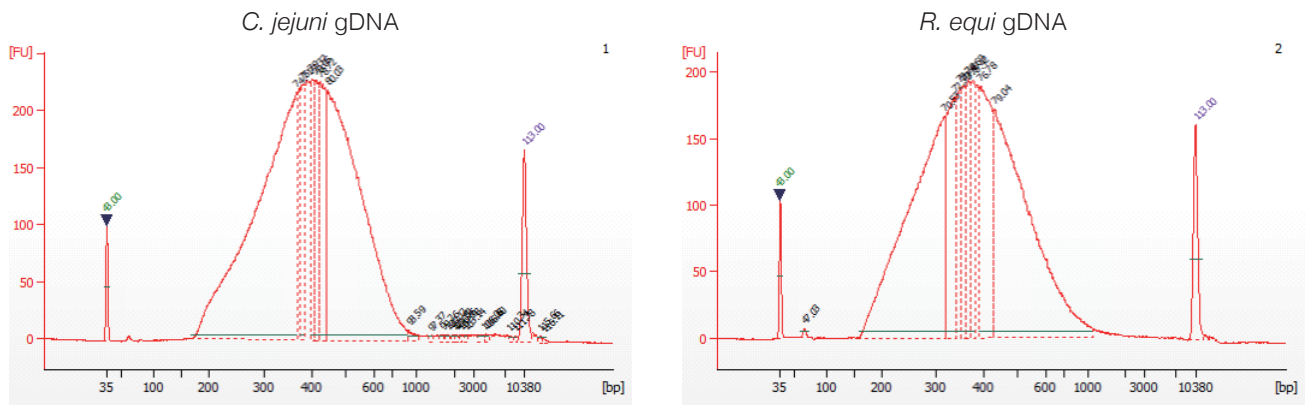
変更される工程の詳細は、『実験方法の補足』を参照

実験条件

サンプル : 菌株由来 genome DNA 2種 (北里大学様からご提供いただいたサンプル)
 DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) にて抽出し、アガロース電気泳動で DNA の分解が無い事を確認済
 ① *C. jejuni* gDNA
 ② *R. equi* gDNA
 インプット量 : 100 ng
 アダプター濃度 : 15 μ M (モル比 アダプター : インサート = 100 : 1)
 断片化条件 : 37°C 30分 (インサートサイズ 200 bp に設定)
 PCR cycle : 5 cycles
 使用プロトコール : KAPA HyperPlus Kit KR1145 – v8.21
 KAPA HyperCap Workflow v3.0

結果：ライブラリーQC

サイズ測定



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)

試薬：High Sensitivity DNA kit (Chips & Reagents) (Cat. Code:5067-4626 アジレント・テクノロジー株式会社)

濃度測定

サンプル名	濃度 (ng/ μ L)	収量 (ng)	Ave. Size (bp)	Peak Top (bp)	Molarity (nM)
<i>C. jejuni</i> gDNA	50.09	1502.8	408	400	198.7
<i>R. equi</i> gDNA	39.25	1177.4	389	367	163.2

機器：Light Cycler® 96システム (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

試薬：KAPA Library Quantification Kits Illumina/Universal (Cat.No. KK4824)

結果：両サンプルでシーケンスに必要な十分量のライブラリを得る事ができた。

まとめ

KAPA Universal Adapter & UDI Primer Mixes は、KAPA Hyper Plus Kit のプロトコールで使用できる。

【注意】

- Library Amplification 工程にて P5/P7 配列および Index 配列を付加させるため、PCR free のアプリケーションを行う場合にはご使用いただく事が出来ません。
- KAPA Universal Adapter は、Full-Length Adapter と同じモル比のプロトコールでライブラリー調製する事が出来ましたが、異なるインプット条件時も同様に使用できるかは、検証、および最適化を行ってからご使用ください。

実験方法の補足

Adapter Ligation 工程

- 以下の試薬のマスターミックスを準備します。

Ligation Master Mix	Volume (μL)
KAPA Ligation Buffer	30
KAPA DNA Ligase	10
Water	5
Total	45

- 5 μLのKAPA Universal Adapter をサンプルを含むウェルに添加してください。
 注) アダプターダイマーの形成を避けるため、Ligation Master Mixを追加する前に、KAPA Universal Adapterを各サンプルに個別に追加する必要があります。
- サンプルと KAPA Universal Adapter を含む各ウェルにLigation Master Mixを 40 μL 添加してください。(総量 110 μL)
- サンプル溶液を完全に混合し、クイックスピンダウンを行います。
- 以下のプログラムを使用して、サーマルサイクラーで反応させます。蓋の温度を50°Cに設定してください。

Step	温度 (°C)	時間 (min)	サイクル	<u>lid temp 50°C</u>
1	20	15	1	
2	4	Hold	1	

- インキュベーション後、直ちに次のステップに進んでください。

KAPA UDI Primer Mixes の調製方法

- KAPA UDI Primer Mixes プレート を 280 xg, 1分間でプレートをスピンドウンします。
- A1ウェルが左上になるように置き、プレートのホイルカバーを慎重に取り外します。
 注) プライマーのクロスコンタミネーションを避けるため、元のホイルカバーは破棄してください。
- マルチチャンネルピペットを使用して、PCR グレードの水を各ウェルの底に 10 μL 添加します。
 注) 必ず都度新しいピペットチップを使用してください。隣接するウェルに液体が飛散しないようにゆっくりと分注してください。
- 各ウェルに 10 μLの水が入っていることを確認し、付属のホイルシールをしっかりと貼り付けてください。
- 280 xgで 30秒間でプレートをスピンドウンさせ、溶液がウェルの底にあることを確認します。
- プレートをボルテックスし、全てのウェルが十分に混合されていることを確認してください。
- 280 xg, 1分間でプレートをスピンドウンしてください。
- 以上の操作で、Library Amplification 工程で使用するKAPA UDI Primer Mixesの準備ができました。
- 未使用のKAPA UDI Primer Mixes は、-15 ~ -25°Cで保存します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDI-P 01	UDI-P 09	UDI-P 17	UDI-P 25	UDI-P 33	UDI-P 41	UDI-P 49	UDI-P 57	UDI-P 65	UDI-P 73	UDI-P 81	UDI-P 89
B	UDI-P 02	UDI-P 10	UDI-P 18	UDI-P 26	UDI-P 34	UDI-P 42	UDI-P 50	UDI-P 58	UDI-P 66	UDI-P 74	UDI-P 82	UDI-P 90
C	UDI-P 03	UDI-P 11	UDI-P 19	UDI-P 27	UDI-P 35	UDI-P 43	UDI-P 51	UDI-P 59	UDI-P 67	UDI-P 75	UDI-P 83	UDI-P 91
D	UDI-P 04	UDI-P 12	UDI-P 20	UDI-P 28	UDI-P 36	UDI-P 44	UDI-P 52	UDI-P 60	UDI-P 68	UDI-P 76	UDI-P 84	UDI-P 92
E	UDI-P 05	UDI-P 13	UDI-P 21	UDI-P 29	UDI-P 37	UDI-P 45	UDI-P 53	UDI-P 61	UDI-P 69	UDI-P 77	UDI-P 85	UDI-P 93
F	UDI-P 06	UDI-P 14	UDI-P 22	UDI-P 30	UDI-P 38	UDI-P 46	UDI-P 54	UDI-P 62	UDI-P 70	UDI-P 78	UDI-P 86	UDI-P 94
G	UDI-P 07	UDI-P 15	UDI-P 23	UDI-P 31	UDI-P 39	UDI-P 47	UDI-P 55	UDI-P 63	UDI-P 71	UDI-P 79	UDI-P 87	UDI-P 95
H	UDI-P 08	UDI-P 16	UDI-P 24	UDI-P 32	UDI-P 40	UDI-P 48	UDI-P 56	UDI-P 64	UDI-P 72	UDI-P 80	UDI-P 88	UDI-P 96

Library Amplification 工程

1. KAPA UDI Primer Mixes プレートを取り出し、解凍してください。
2. 280 xg, 30 秒間でプレートをスピンドアウンしてください。
3. 適切な（使用する）ウェルのホイルシールを剥がすか、穴を開けます。
注） ホイルシールに穴を開ける場合は、ウェルごとに新しいピペットチップを使用してクロスコンタミネーションを避けてください。
使用したKAPA UDI Primer Mixes のウェル位置を記録し、ホイルシール等でシーリングして保管してください。
4. 5 μ L のKAPA UDI Primer Mixes を各サンプルに添加します。
5. 25 μ L のKAPA HiFi Hotstart ReadyMix を各サンプルに添加します。
6. サンプル溶液を完全に混合し、クイックスピンドアウンを行います。
7. 以下のプログラムを使用して、サーマルサイクラーで反応させます。蓋の温度を 105°C に設定してください。

Step	温度 (°C)	時間 (min)	サイクル	<u>lid temp 105°C</u>
1	98	45	1	
2	98	15		
3	60	30	5	
4	72	30		
5	72	60	1	
6	4	Hold	∞	

8. インキュベーション後、直ちに次のステップに進んでください。