

KAPAリアルタイムライブラリー増幅キット



クイックガイド

Cat.No.

KK2700	10×50 μ L反応 (トライアルキット)	1×0.25 ml KAPA HiFi HotStart リアルタイムPCRマスターミックス (2X) 4×1.5 mlの蛍光スタンダード
KK2701	50×50 μ L反応	1×1.25 ml KAPA HiFi HotStart リアルタイムPCRマスターミックス (2X) 4×1.5 mlの蛍光スタンダード
KK2702	250×50 μ L反応	1×6.25 ml KAPA HiFi HotStart リアルタイムPCRマスターミックス (2X) 4×1.5 mlの蛍光スタンダード

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、シークエンス前のDNA量を増幅させる場合に使用します。ライブラリーのPCRエンリッチ中に、増幅バイアスを最小限に抑えることは、均一なシークエンスのカバレッジを確保するうえできわめて重要となります。DNAポリメラーゼが複雑な配列分布を持つそれぞれのライブラリーを同等の効率で増幅できない場合、増幅バイアスが生じます。ライブラリーが過度に増幅された場合、バイアスはさらに強まります。

KAPAリアルタイムライブラリー増幅キットは、PCRによるバイアスのどのようなソース (ATリッチ / GCリッチ) にも対応できるように設計されています。高度な再現性とプロセスビティを誇る、新製品のKAPA HiFi DNAポリメラーゼは、複雑なライブラリー DNAをバランスよく増幅できます。ライブラリーの増幅のリアルタイムでのモニタリングからは、過剰な増幅を最小限に抑えるために必要な補足情報が提供されます。次世代シークエンスのライブラリー増幅用のハイフィデリティー・リアルタイムPCRを行うメリットは、以下のとおりです。

- リアルタイムに増幅をモニタリングすることにより、電気泳動でPCRの最適なサイクル数を確認するよりも正確なコントロールが可能になります。
- リアルタイムでの増幅のワークフローは、自動化に適用できます。
- リアルタイムの増幅プロットにより、コストと時間のかかるエンリッチ後のゲル電気泳動確認が不要となり、ライブラリー間のバラツキが抑制できます。
- KAPAライブラリー定量化キットとのシームレスな統合が可能です。

KAPAリアルタイム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ミックスしたKAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックス (2X) が含まれています。この2X マスターミックスは、専用反応バッファー中にKAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼが含まれているほか、dNTP、MgCl₂ (1Xで2.5mM)、SYBR® Green I、および酵素安定化剤を含有しています。蛍光スタンダードは4種あり、最適な増幅領域の定義にこれらを利用します (図1および2)。

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、比類なき正確性を示します。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、補助タンパク質の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、ひいてはシークエ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ポリメラーゼのエラー率は、 2.8×10^{-7} 未満です。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、ブレンドタイプのポリメラーゼより最高30倍高い値です。反応時のSYBR® Green I色素の存在によってハイフィデリティーが損なわれることはありません。KAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックスで生成されたDNAフラグメントは、制限酵素消化やシークエンスなどのルーチンのダウンストリームのアプリケーション用として使用可能です。KAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックスで生成された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。

● 保存

遮光して-20℃で保存してください。

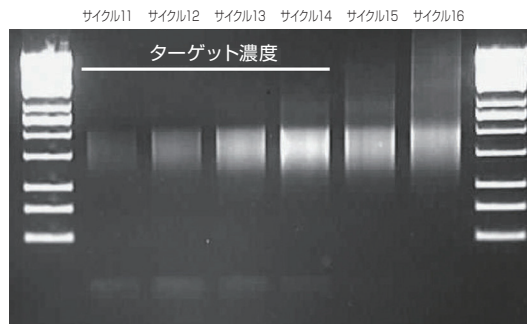
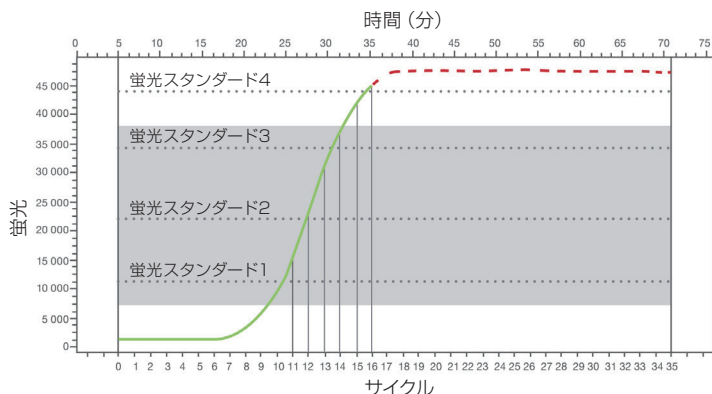
クイックノート

- KAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックス (2X) と蛍光スタンダード1~4は感光性であるため、保管、解凍、反応のセットアップ中には必ず遮光してください。
- KAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックス (2X) 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。
- NGSアプリケーションに最適な増幅サイクルは、蛍光スタンダード1~3の範囲の領域に対応しています。終了サイクル数はこれに応じて調整するため、ゲル電気泳動での確認は不要です (図1を参照)。
- プライマー間およびプライマー内の相互作用に起因するバックグラウンドの蛍光を最小限に抑えるには、データ収集時の正しい温度を厳守することが重要となります (表1を参照)。
- 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。

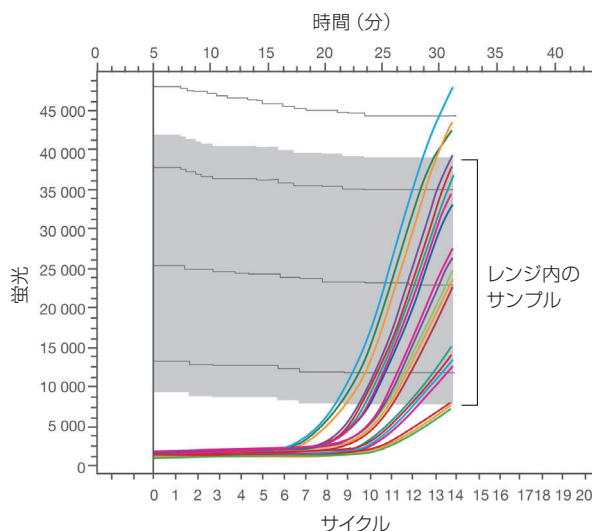
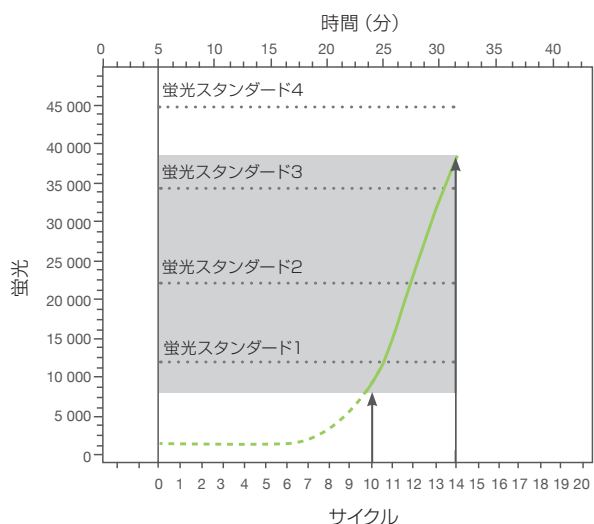
KAPAリアルタイムライブラリー増幅キット

2. 概要

次世代DNAシーケンスライブラリーのリアルタイム・ハイフィデリティー増幅



ライブラリーを、SYBR® Green Iベースのリアルタイム・ハイフィデリティー PCRマスターミックスを用いて増幅しました (左図)。キットには4種類の蛍光スタンダードが含まれており、それぞれ別のDNA濃度を示します。スタンダード1と3の間で終了した反応は、最適なライブラリー増幅レンジを示しており (グレー部分)、ここではサイクル10 ~ 14に相当します。ゲル画像は、異なるサイクルでそれぞれ実施した、一般的なライブラリーの増幅ステップです (右図)。低分子量および高分子量の非特異増幅産物は、サイクル数を増やすにつれて増加します。



目的の濃度レンジ (グレー部分) の下限 (点線/サイクル10) から上限 (実線/サイクル14) で終了した反応に対する増幅プロットを示したグラフです。

ライブラリー増幅反応は、指定ターゲット濃度の範囲内で終了させるのが理想です。

複数ライブラリーのリアルタイム・ハイフィデリティー増幅の例です。64倍までの濃度レンジ (6サイクル) に渡る20のライブラリーを同時に増幅し、14サイクル後に終了しました。20のうち14のライブラリーがターゲット増幅レンジ内に収まりました。残りの6ライブラリーは、最適濃度レンジから外れている可能性はあるものの、個別に再び増幅するか、そのまま使用することも可能です。

KAPAリアルタイム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リアルタイムPCRマスターミックス (2X) のチューブ、および蛍光スタンダード1~4を室温で解凍します。
- 解凍済みのKAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックス (2X)、プライマー、および蛍光スタンダード1~4を600xgで5秒間、遠心（スピンドウン）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（スピンドウン）します。
- 特定のライブラリーごとの設定については、表1に記載の推奨サイクリングプロトコールに従い、リアルタイムサーマルサイクラーに予めプログラムします。

2: 反応のセットアップ

各プレートには必ず、増幅を必要とするライブラリーにつき50 μ LのリアルタイムPCR反応液1回分とともに、蛍光スタンダード1~4を1セット（それぞれ3反復）準備します。

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。dsDNAテンプレート>100ngがPCR反応液50 μ Lあたりに加えられた場合、高いバックグラウンドの蛍光ノイズが生じることがあります。

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。

2.1: サンプルのセットアップ

- 25 μ Lの KAPA HiFi HotStartリアルタイムPCRマスターミックス (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。

2.2: 蛍光スタンダードのセットアップ

- それぞれ50 μ L分の蛍光スタンダードをトリPLICATE (n=3) でリアルタイムPCRプレートのウェルに加ええます。
- 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。

- 従来のエンドポイントPCRがすでに問題なく活用されている場合、またライブラリーの同量・同タイプがKAPA HiFi HotStartリアルタイムPCR反応に加えられる場合は、すでに使用されているものと同じサイクル数でリアルタイムサーマルサイクラーをプログラムします。
- 蛍光検出が確実に72 $^{\circ}$ Cで実施されることが重要となります。

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

はじめに、生データ（バックグラウンド減算なし）の線形リアルタイム増幅プロットは、増幅された各ライブラリーの増幅のレベルをバリデーションするために組み込まれている品質測定の基準として利用できます。

- qPCRサイクリングの終了後にライブラリーの線形増幅プロファイルが蛍光スタンダード1を有意に下回る場合、PCRの精製後のシークエン스에十分なライブラリーが存在する可能性は低くなります。
- qPCRサイクリングの終了後にライブラリーの線形増幅プロファイルが蛍光スタンダード3を有意に上回る場合、ライブラリーは過剰に増幅されています。これは、1)増幅バイアス、2)エラーの発生、および/または3)キメラPCR産物の存在につながる可能性があります。

またこのデータは、複数のライブラリー間でライブラリーを調製する場合、バラツキの有無を特定する品質管理の基準としても有用です。

注：増幅プロットは、終了サイクルを予めプログラムせずに、リアルタイムに利用して最適なサイクルを選択することもできます。その場合の具体的な方法は以下のとおりです。

1. リアルタイムサーマルサイクラーに30サイクルをプログラムします。
2. リアルタイムサーマルサイクラーの始動後、リアルタイム反応を終了する前に、目的のライブラリーの蛍光が達成されるまで待ちます。

注：72℃でデータ収集した直後に、また次のサイクルが開始される95℃までチューブの温度が上昇する前に、反応を終了することがきわめて重要です。これにより、エンリッチされたライブラリー DNAはダウンストリームの精製用に最適な二本鎖のままとなります。

PCRエンリッチ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。

5.1: ライブラリーの定量

増幅可能なライブラリーの分子の正確な定量は、次世代のシークエ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の多すぎるクラスターを引き起こし、不良なクラスター解像度につながる可能性があります。どちらの場合も、最適以下のシークエ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クエンシング用のインデックス付きライブラリーをプールしている場合は、正確なライブラリーの定量も同時に重要です。

KAPAリアルタイムライブラリー増幅キットを適切なKAPAライブラリー定量キット (KK4824, KK4835, KK4844, KK4854) と統合し、正確にPCRで増幅可能な分子の数を定量します。ライブラリーが蛍光スタンダード1~3の間で終了している場合、KAPAライブラリー定量キットを使用しているライブラリーの定量には、各ライブラリーとも1,000倍の希釈1回分が必要となります。

KAPAリアルタイム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。

 **日本ジェネティクス株式会社** <http://www.n-genetics.com>

本社：〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18F Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962
西日本営業所：〒604-8277 京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィーネ御池3F Tel. 075 (257) 5421 Fax. 075 (257) 5422

2013年10月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。10P1310