



Application

酵素による断片化方法を含むKAPA HyperPlus Kitを用いたライブラリ作製方法の検討

- ・クマムシ および ジョロウグモDNAを用いた断片化条件検討
- ・クマムシcDNA (1個体) および微量DNA (1ng) を用いたライブラリ作製

製品名

KAPA HyperPlus Kit (for illumina) (KK8510, KK8512, KK8514)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、慶應義塾大学 先端生命科学研究所 荒川 和晴 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

クマムシやクモなどの非モデル無脊椎動物についてはメーカーからのデータが通常不足しているため、個別に検証を行う必要がある。KAPA HyperPlus Kitは主に 1. 酵素法で、切断箇所のランダム性が高く反応時間によって断片化長を変えられる点、及び、 2. 他社と比して高いライゲーション効率、を謳っており、これは主にRNA-Seqなどで多検体を同時処理する際の並列性と、微量なサンプルから実験をスタートする際に有効であることが期待される。そこで、本アプリケーションノートでは非モデル脊椎動物であるクモとクマムシを用いてこの2点を検証した。



©STARUDI

実験 1 genomic DNA の断片化

方法

生物種:

Hypsibius dujardini (クマムシ: イギリスから採取) GC=45%

Nephila clavata (ジョロウグモ) GC=30%

Input DNA抽出方法: *Hypsibius dujardini* → MagAttract HMW DNA Kit (QIAGEN)

Nephila clavata → Quick-gDNA MicroPrep (Zymo)

Input DNAバッファー組成: 10mM Tris-HCl (pH7.5)

断片化方法:

- Covaris M220/XTU microTUBE-15
- 他社断片化酵素
- KAPA HyperPlus Kit 使用したサーマルサイクラー: LifeEco(Bioer)

断片化条件: 37°C

2.5 min
5 min
7.5 min
10 min
15 min
20 min
25 min
30 min

Input DNAの条件

断片化	Input DNA量 [ng]
Covaris	150
他社断片化酵素	50
KAPA HyperPlus Kit	150

KAPA HyperPlus Kitの断片化条件

断片化 時間 [min]	ターゲットサイズ [bp] (KAPA社プロトコル)
2.5	
5	600
7.5	
10	350
15	
20	200
25	
30	150

<KAPA HyperPlus Kitの断片化のワークフロー>

1. Conditioning solutionの準備

(サンプル中のEDTAの濃度に合わせて調製する)

本条件で使用したインプットDNAのバッファー組成は、
10mM Tris-HCl (pH 7.5) (EDTAなし)

このため、Conditioning solutionは使用しなかった

例) サンプルがTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)
5μLに溶解しているとき

final EDTA conc. = 0.1mM

EDTA 0.1mM Conditioning solution :

Conditioning solution (per 100μL) 6.5μL

PCR-grade water (per 100μL) 93.5μL

Conditioning solution の組成

Final EDTA concentration in 50μL rxn	Dilution Factor	Volume of Conditioning Solution (per 100μL)	Volume of PCR-grade water (per 100μL)
0.02-0.05 mM	32.0	3.1 μL	96.9 μL
0.1 mM	15.4	6.5 μL	93.5 μL
0.2 mM	7.4	13.5 μL	86.5 μL
0.3 mM	4.8	21.0 μL	79.0 μL
0.4 mM	3.3	30.0 μL	70.0 μL
0.5 mM	2.6	38.8 μL	61.2 μL
0.6 mM	2.2	46.5 μL	53.5 μL
0.7 mM	1.8	56.0 μL	44.0 μL
0.8 mM	1.6	64.0 μL	36.0 μL
0.9 mM	1.4	72.0 μL	28.0 μL
1.0 mM	1.3	80.0 μL	20.0 μL

2. 下記の組成でそれぞれの断片化反応を行う
(本条件では、EDTAを含まない溶液を使用したため、Conditioning solutionは使用していない)

Component	Volume	KAPA 社推奨	Volume
Double-stranded DNA	1 μ L		5 μ L
PCR grade water	6 μ L		30 μ L
KAPA Frag Buffer (x10)	1 μ L		5 μ L
KAPA Frag Enzyme	2 μ L		10 μ L
Total volume	10 μ L		50 μ L

ポイント

EDTAを含む溶液を使用する場合は、PCR grade water : 30 μ L の代わりに、1で作成したConditioning solution : 5 μ L PCR grade water : 25 μ L の割合で調整したConditioning solutionをご使用ください

3. サーマルサイクラーを用いてインキュベーションする

Step	Temp	Time
Pre-cool block	4 $^{\circ}$ C	N/A
Fragmentation	37 $^{\circ}$ C	
HOLD	4 $^{\circ}$ C	∞

※サーマルサイクラーのHeat lidはOFF

4. 断片化したサンプルをEnd Repair と A-tailing反応を行うために、溶液調製する

Component	Volume	KAPA protocol	volume
Fragmented, double-stranded DNA	10 μ L		50 μ L
End Repair & A-Tailing Buffer*	1.4 μ L		7 μ L
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix*	0.6 μ L		3 μ L
Total volume	12 μ L		60 μ L

5. サーマルサイクラーを用いてインキュベーションする

Step	Temp	Time
End repair and A-tailing	65 $^{\circ}$ C	30 min
HOLD	4 $^{\circ}$ C	∞

※サーマルサイクラーのHeat lidは85 $^{\circ}$ C

結果

TapeStationによる断片化の結果が下記である。

Hypsibius dujardini genomic DNA (GC=45%)

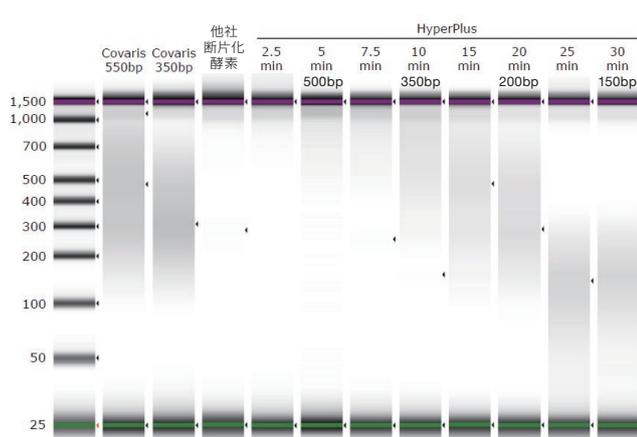


Fig.1 TapeStation(D1000)による断片化の結果

GC がヒトなどに比べて高いからか、Covaris でも HyperPlus でもカタログ通りの数字からは少しずれるが、HyperPlus ではほぼ時間に比例したサイズが得られている。

Nephila clavata genomic DNA (GC=30%)

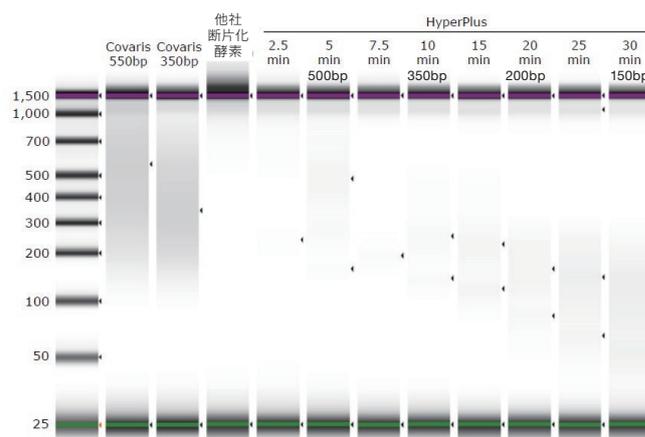


Fig.2 TapeStation(D1000)による断片化の結果

AT-rich なリピートが多いせいか、他社断片化酵素での切断効率が著しく悪い。Covaris はカタログ通り、HyperPlus はほぼ時間に比例したサイズが得られている。

実験 2 *Acutuncus antarcticus* (クマムシ:南極から採取) のsingle individual RNA-seqライブラリを作製

方法

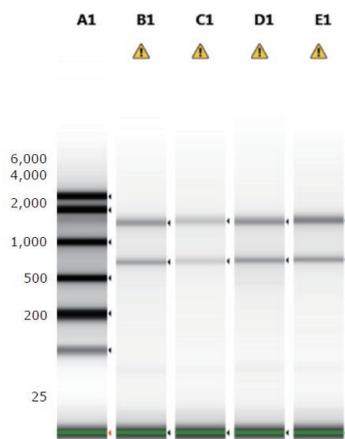
初発サンプル量	: おおよそ数百pg
生物種	: <i>Acutuncus antarcticus</i> (クマムシ:南極から採取)
RNA抽出方法	: Direct-zol 組織 1個体(体長約300 μ m, 幅約100 μ m)
cDNA調製	: SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit
Input cDNAバッファー組成	: 10mM Tris-HCl (pH7.5)
cDNA断片化方法	: KAPA HyperPlus Kit
断片化条件	: 37°C, 20 min
ライブラリ調製	: KAPA HyperPlus Kit illumina® platforms (KAPA BIOSYSTEMS)
アダプター	: TruSeq RNA Sample Prep Kit v.2アダプター
シーケンサー	: MiSeq (illumina)



©TARUDI

結果
<Workflow>

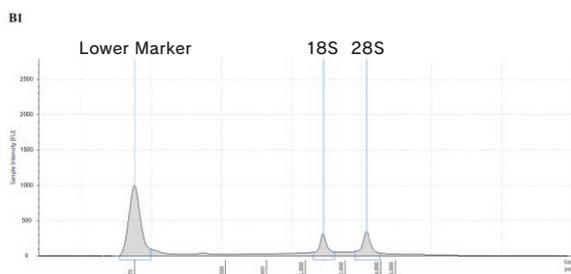
1. Total RNAの抽出 Direct-zolで抽出後
- ↓
2. quantification Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用
- QC Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)を使用
- QC TapeStation High Sensitivity RNA Screen Tape(Agilent)を使用



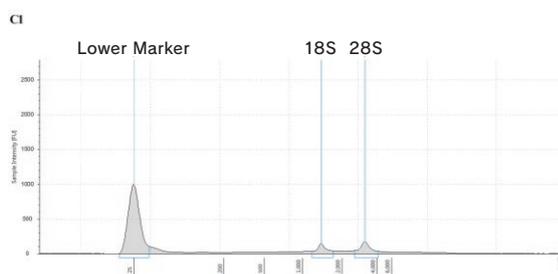
Well	RINe	28S/18S (Area)	Conc. [μ g/ μ l]	Sample Description	Alert	Observations
A1	-	-	3750			Ladder
B1	8.4	1.3	335		⚠	RNA concentration outside recommended range for RINe
C1	7.3	1.4	235		⚠	RNA concentration outside recommended range for RINe
D1	7.9	1.2	370		⚠	RNA concentration outside recommended range for RINe
E1	8.7	1.6	360		⚠	RNA concentration outside recommended range for RINe

RIN 8.4

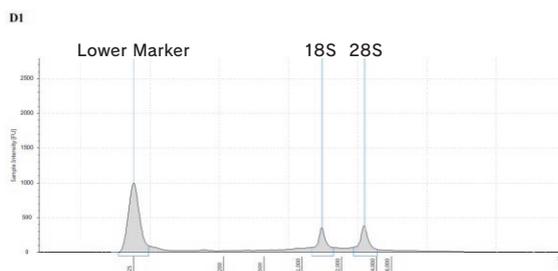
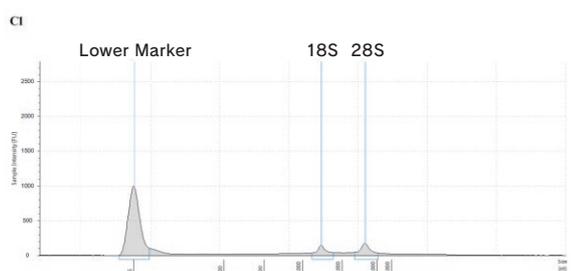
RIN 7.3



RIN 7.9



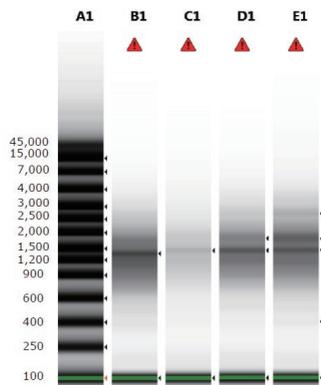
RIN 8.7



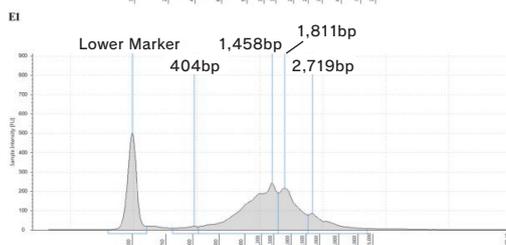
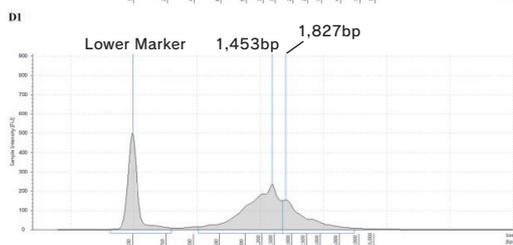
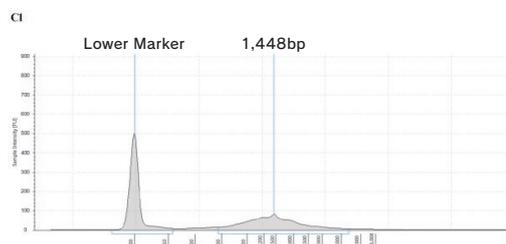
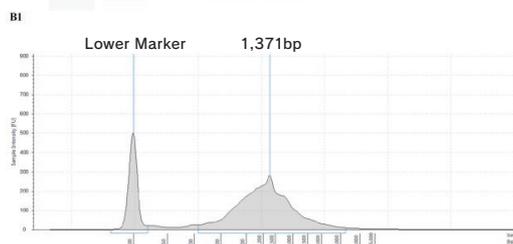
- ↓
3. cDNA synthesis (input RNA おおよそ数百pg) SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kitを使用
- 増幅サイクル : 20
- ↓



4. quantification Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 QC TapeStation Genomic DNA ScreenTape (Agilent) を使用



Well	DIN	Conc. [ng/μl]	Sample Description	Alert	Observations
A1	-	112	Ladder		Ladder
B1	-	27.2		⚠	The original ladder for this lane had too few peaks
C1	-	7.88		⚠	The original ladder for this lane had too few peaks; Sample concentration outside recommended range
D1	-	19.2		⚠	The original ladder for this lane had too few peaks
E1	-	25.5		⚠	The original ladder for this lane had too few peaks



5. Enzymatic Fragmentation 断片化条件 : 37°C, 20 min

Component	Volume	KAPA protocol volume
Double-stranded DNA (with KAPA Frag Conditioning Solution, if needed)	7 μL	35 μL
KAPA Frag Buffer (x10)	1 μL	5 μL
KAPA Frag Enzyme	2 μL	10 μL
Total volume	10 μL	50 μL



6. End Repair and A-tailing

Component	Volume	KAPA protocol volume
Fragmented, double-stranded DNA	10 μL	50 μL
End Repair & A-Tailing Buffer	1.4 μL	7 μL
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	0.6 μL	3 μL
Total volume	12 μL	60 μL



7. Adapter Ligation

Component	Volume	KAPA protocol volume
End repair and A-tailing reaction product	12 μL	60 μL
Adapter stock (concentration as required)	1 μL	5 μL
PCR-grade water	1 μL	5 μL
Ligation Buffer	6 μL	30 μL
DNA Ligase	2 μL	10 μL
Total volume	22 μL	110 μL



8. Post-ligation Cleanup

Component	Volume	KAPA protocol volume
Adapter ligation reaction product	22 μL	110 μL
Agencourt® AMPure® XP reagent	17.6 μL	88 μL
Total volume	39.6 μL	198 μL





↓
9. Library Amplification

Component	Volume	KAPA protocol volume
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μ L	25 μ L
10X KAPA Library Amplification Primer Mix	2.5 μ L	5 μ L
Adapter-ligated library	10 μ L	20 μ L
Total volume	25 μ L	50 μ L

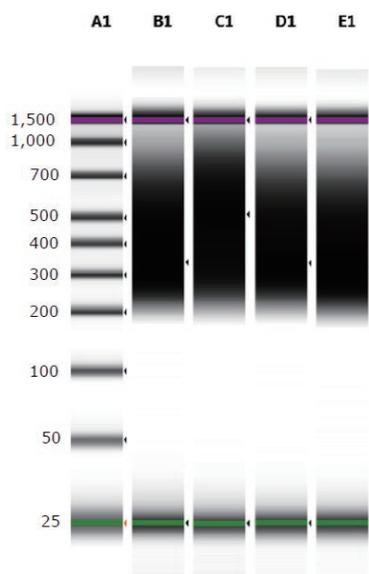
↓
10. Library Amplification (continued)

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98°C	45 sec	1
Denaturation	98°C	15 sec	10
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	1 min	1
HOLD	4°C	∞	1

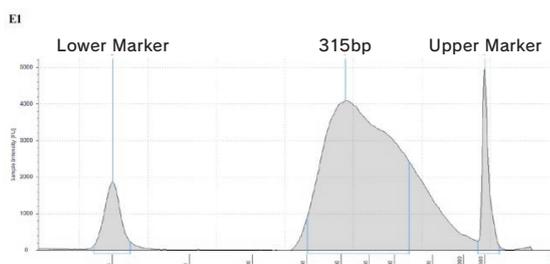
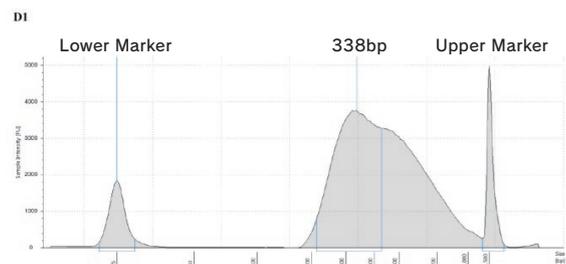
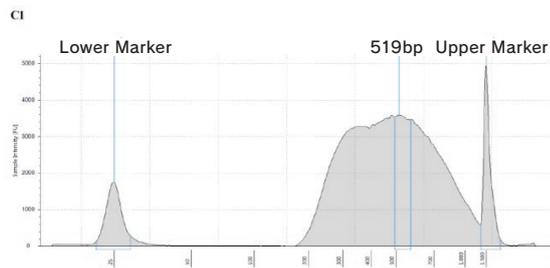
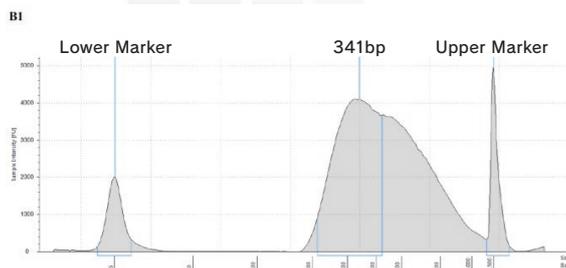
} Minimum number required
for optimal amplification

↓
11. Post-amplification Cleanup

↓
12. quantification..... Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用
QC..... TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent) を使用



断片化時間：20min
目的断片サイズ：200bp
目的ライブラリサイズ：320bp



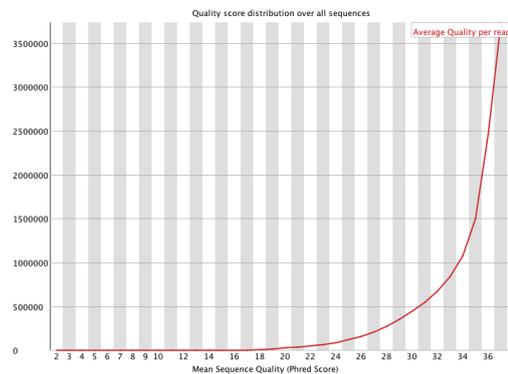
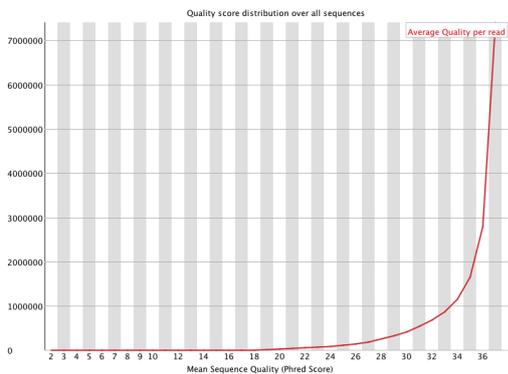
Well	input ds cDNA(ng)	Final Adapter conc(nM)	PCR cycle amplification Library conc(ng/ul)	total Library(ng)
B1	50 ng	25 μ M	86.7 ng/ μ L	1300.5 ng
C1	50 ng	25 μ M	91 ng/ μ L	1365 ng
D1	50 ng	25 μ M	102 ng/ μ L	1530 ng
E1	50 ng	25 μ M	98.2 ng/ μ L	1473 ng



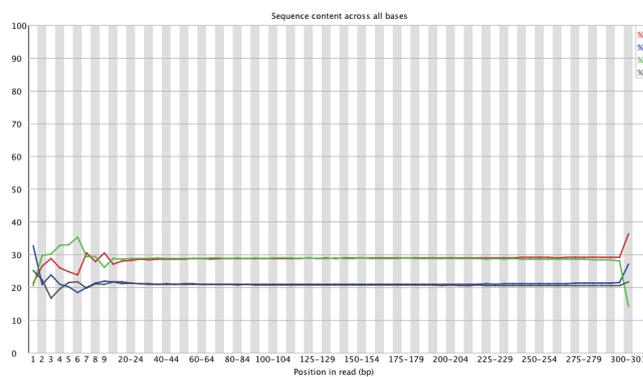
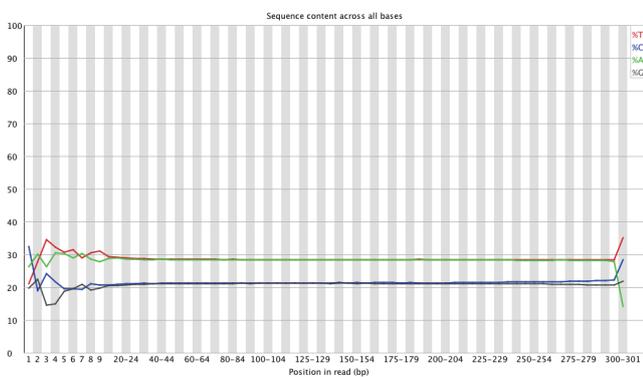
Covaris + 他社Low inputライブラリ作製キット

KAPA HyperPlus Kit

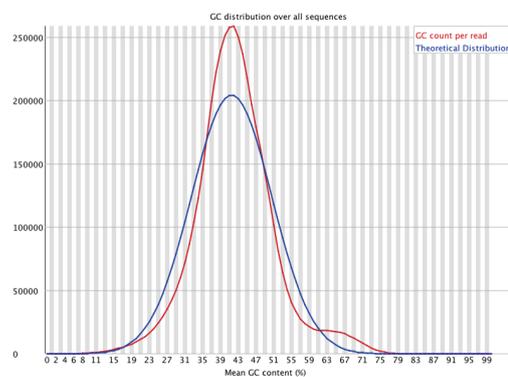
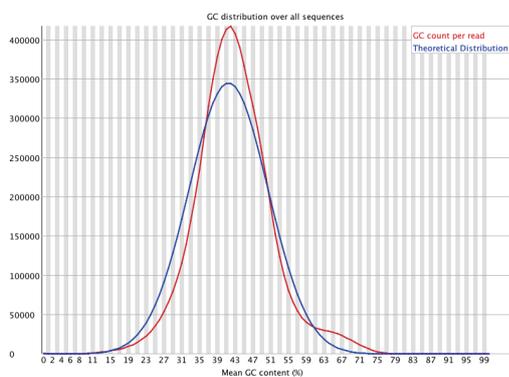
Per sequence quality scores



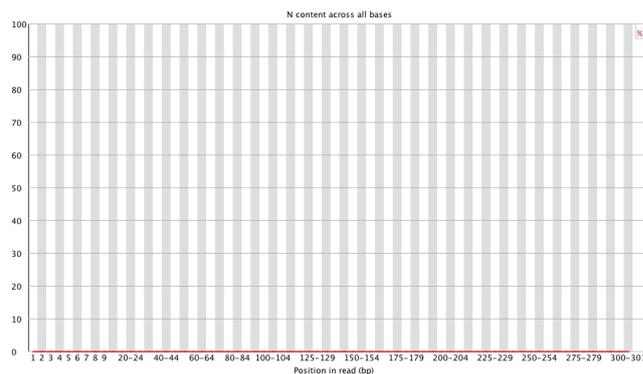
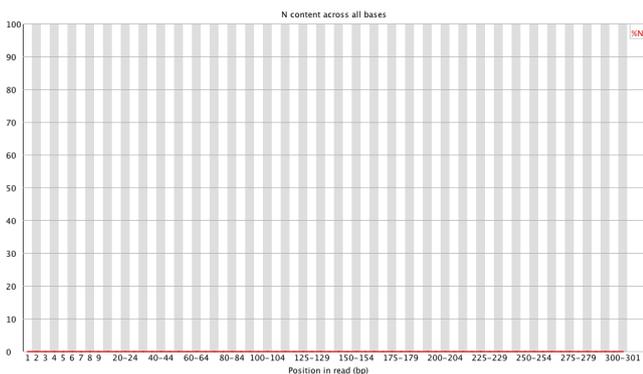
Per base sequence content



Per sequence GC content



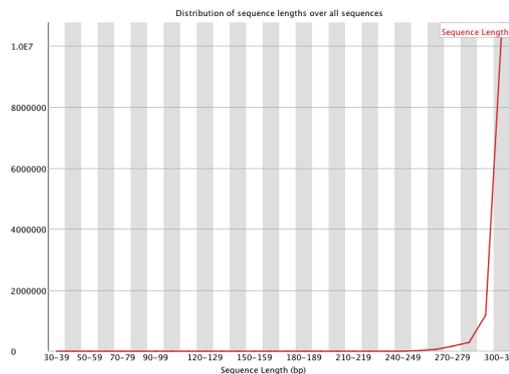
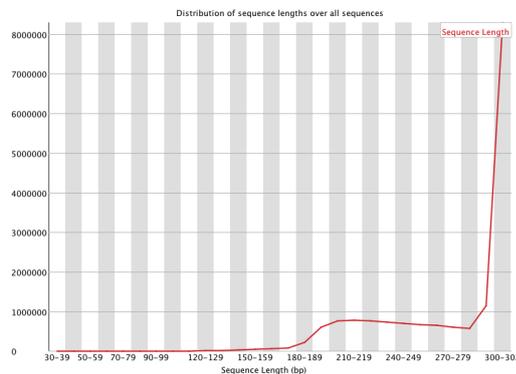
Per base N content



Covaris + 他社Low inputライブラリ作製キット

KAPA HyperPlus Kit

Sequence Length Distribution



● まとめ

全てのデータにおいて、Covaris + 他社Low inputライブラリ作製キットとKAPA HyperPlus Kitの間には基本的に差がなかった。特に、Per base sequence contentに関しては、KAPA HyperPlusでもCovarisよりは偏りが見られるものの、結果にそれほど大きく差が見られなかった。(他社断片化酵素の場合、最初の10bp程度にもう少し強いバイアスが見られる(no data))

ただし、Sequence Length Distributionに関しては、シーケンス前にライブラリを下記の条件でサイズセレクションしている。

Covaris + 他社Low inputライブラリ作製キット=300-1000bpを切り出し

KAPA HyperPlus Kit=400-1000bpで切り出し

この影響でCovaris + 他社Low inputライブラリの方に短めの断片が少しでてしまったと考えられる。

	Covaris + 他社Low inputライブラリ作製キット	KAPA HyperPlus Kit
Number of reads	34,648,529	26,180,631
Mapped reads	27,566,045 / 79.56%	20,253,892 / 77.36%
Duplication rate	43.77%	23.25%
GC Percentage	40.84%	40.1 %
Coverage mean	39.99	32.62

<お客様のコメント>

1. TapeStationでの可視化が困難なため多めの量でこの試験は行っているが、SMART-Seq v4でのライブラリ調整や1ngからのサンプル調整からもわかるように、微量な初発量からでも安定してライブラリが作成できた。
2. DNAのGC含量や配列の特徴によって切断時間はある程度変動があるが、基本的に同じDNAを使えば時間に比例して任意の長さの断片が得られた。ただし、Covarisの方が目的断片の量はやや多く得られる印象。個人的にはゲノムなど長さがCriticalな場合にはCovarisが第一選択肢になる。一方、RNA-Seq (定量目的) の場合は長さは一定以上あれば特に問題なく、非常に多検体を扱うため、そういった場合にはHyperPlusが明らかに第一選択肢になる。
3. 酵素法のため、サンプルを並列処理でき、Covarisに比べて圧倒的に作業が楽で効率が良い。
4. 他社のKitはアダプターライゲーション反応が10μl程度などの少量で行うものが多いが、KAPAはFragmentationの段階から50μlで、反応系縮小の余地がある。これは微量サンプルを扱う時に非常に有利(1/5反応系だと実質濃度を5倍あげられる)であり、大変経済的である。
5. ある程度収量を得る事を考えると、最後のPCR増幅だけは1/5までは反応系を下げられない。しかし、この段階はPCR用Illuminaアダプターに対応した自作オリゴとKAPA HiFi HS Ready Mixを使うことで安く増幅ができることを確認 (他社酵素ではうまくいかなかった)

Primer-1 AATGATACGGCGACCAACCGAGA

Primer-2 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAG OPC精製 (Eurofins)



慶應義塾大学
先端生命科学研究所
荒川 和晴 様