

KAPAハイパーピュアビーズ

KR1705 - v2.20

このテクニカルデータシートは、NGSワークフローにおけるKAPAハイパーピュアビーズの製品情報および詳細なプロトコルを提供いたします。

この文書はKAPAハイパーピュアビーズ（08963835001、08963843001、08963851001、08963860001、08963878001）全てに適用されます。

目次

製品概要	2
製品仕様	2
出荷・保存時の注意	2
使用前の準備	2
廃棄方法	2
品質管理	2
安全性情報	2
注意事項	2
廃棄物処理の方法	2
KAPAライブラリー調製キットとの互換性	2
重要なパラメーター	3
全体のパフォーマンスに影響を及ぼす要因	3
DNA精製（クリーンアップ）	3
NGSワークフローにおけるサイズセレクション	4
プロトコル	5
ゲノムDNA精製（クリーンアップ）	5
RNA精製（クリーンアップ）に関する諸注意	5
NGSワークフローにおける断片化DNAの精製	6
NGSにおけるサイズセレクション	7
付録-トラブルシューティング	10
制限および責任	11
購入者に対する注意：限定的な製品保証内容	11
購入者に対する注意：使用用途の限定	11

Kapa/Rocheの製品コードおよび内容物

KK8007 08963835001	KAPAハイパーピュアビーズ	5 mL
KK8008 08963843001	KAPAハイパーピュアビーズ	30 mL
KK8009 08963851001	KAPAハイパーピュアビーズ	60 mL
KK8010 08963860001	KAPAハイパーピュアビーズ	450 mL
KK8011 08963878001	KAPAハイパーピュアビーズ	4×60 mL

クイックノート

- 本キットは、1回の反応で1 ng~5 µgの範囲で、DNAを迅速かつ効率的に精製するために設計されています。
- 本キットは、"with-bead"プロトコルを実装したKAPAライブラリー調製キットとは互換性はありません。検証済みのワークフローについては、KAPAライブラリー調製キットとの適合性 (p.2) の項を参照してください。
- 本キットは、用手法および全自動精製にも対応しています。
- 本キットは、製品性能に影響を及ぼさない様、ドライアイスと同梱して発送する場合がございます。受領次第、2~8℃で遮光保存をしてください。
- 最適な性能を得るためには、本キットが室温状態になっていること、使用前にビーズを完全に再懸濁されていること、結合インキュベーション前にDNA溶液とビーズ溶液が十分に混合されていることを確認してください。
- いくつかの要因がDNAの回収と排除の効率に影響を及ぼす可能性があります。詳細は重要なパラメーターの項 (p.3) を参照してください。

製品概要

KAPAハイパーピュアビーズは、次世代シーケンシングおよび他の分子生物学ワークフローにおける一本鎖および二本鎖DNAの精製またはサイズセレクションのために最適化された常磁性ビーズの懸濁液です。本キットは、1回の反応で1 ng~5 µgのDNAを迅速かつ確実に精製又はサイズ選択するために設計されています。本キットは用手法または自動精製操作の両方に互換性があり、両方のフォーマットでインプットDNAの効率的な回収を可能にします。DNAの精製およびサイズ選択のために、KAPAハイパーピュアビーズのバッファーは、最適化された濃度のPEG/NaClといったクラウディング成分を含み、DNA分子がビーズにより結合しやすくなるように調製されています。ビーズ懸濁液のサンプルに対する容積比は、ビーズによって保持されるDNA断片のサイズ分布を決定する重要な因子です。体積比は特定のアプリケーションやライブラリー調製時の精製またはサイズセレクションにおいて、修正/最適化することができます。

製品仕様

出荷・保存時の注意

本キットは、ドライアイスまたは保冷剤で冷やされた状態で発送されます。受領後は、直ちに2℃~8℃の冷蔵庫で保管し、-15℃~-25℃の条件下で保管しないでください。

本キットは光に敏感であり、使用しない場合は必ず遮光して保管してください。これらの条件下で保存し、正しく取り扱った場合のみ、本キットはキットラベルに表示された使用期限まで性能が保証されます。

使用前の準備

使用前に本キットが室温に戻され、完全に再懸濁されていることを必ず確認してください。

廃棄方法

本キットはバイオハザード廃棄物として適切な方法で廃棄してください。

品質管理

キット構成は全て、厳しい機能品質管理を受けDNA汚染に関して厳しい要件を満たしています。詳しい情報については、日本ジェネティクス株式会社にお問い合わせください。

安全性情報

注意事項

- すべてのサンプルは、感染の可能性があるものとして、安全な作業手順でお取り扱いください。サンプル中の潜在的病原体の感度と力価は変動する可能性があるため、操作者は病原体の不活化を最適化し、安全規制に従った適切な措置に従ってください。
- 実験室エリアでの飲食、喫煙はしないでください。
- ピペットを口で取り扱わないでください。
- サンプルやキット試薬を扱う際は、保護用ディスポーザブル手袋、白衣、安全ゴーグルを着用してください。
- サンプルや試薬の取り扱い後は手をよく洗ってください。

廃棄物処理の方法

- 未使用の試薬や廃棄物は各地域、自治体、施設の規制に従って廃棄してください。

KAPAライブラリー調製キットとの互換性

本キットは、以下のライブラリー調製キットとの併用が検証されています。

- » KAPA ハイパープレップキット
- » KAPA ハイパープラスキット
- » KAPA リボイレーズ (HMR) キット*

詳しい情報やプロトコールについては、各ライブラリー作成キットに含まれるテクニカルデータシートをご確認ください。

* 独立型キット (07962266001および07962274001) のみ

本キットは「with-beads」プロトコールを実装した以下のライブラリー調製キットとは互換性がありません。

- » KAPA HTPおよびLTPライブラリー調製キット
- » KAPA RNAハイパープレップキット with RiboErase (HMR) または、with RiboErase (HMR) Globin
- » KAPA RNAおよびmRNA ハイパープレップキット
- » KAPA Stranded RNA-Seq Kit with RiboErase (HMR) または with RiboErase (HMR) Globin

これらのライブラリー調製キットには、「with-beads」プロトコールでの洗浄に最適化されたKAPAピュアビーズとPEG/NaCl溶液の溶液が含まれています。このビーズキットは本キット (KAPAハイパーピュアビーズ) とは異なるものですのでご注意ください。

重要なパラメーター

全体のパフォーマンスに影響を及ぼす要因

- DNAのビーズへの結合が行われる際の温度は、目的のDNA断片長を回収するために重要となります。使用前に必ずビーズを室温に戻してください。
- ビーズは時間とともに徐々に沈んでいきます。ビーズ懸濁液を吸引する前に、必ずビーズ懸濁液が完全に懸濁されていることを確認してください。ビーズ懸濁液を大量 (450 mLなど) に使用する場合は特に注意してください。
- クリーンアップやサイズセレクションにおける液量がパフォーマンスに影響することがあります。DNAサンプルを10 mM Tris-HCl (pH 8.0- 8.5) またはPCRグレードの水で希釈して、ビーズの添加前に液量を増加させることも可能です。精製開始時の液量が50 µL未満、もしくは粘性がある場合、高濃度の塩またはPEGを含むDNAサンプルの場合には液量を増加させることが推奨されます。
- DNA結合時の、DNAとビーズの混合は、DNA回収率に大きく影響します。ボルテックスミキサーやピペティング等でよく混合してください。
- 本キットのプロトコルで提供するインキュベーション時間はあくまでも目安となる時間です。インキュベーション時間は、効率やスループットを最大化するために、現在のプロトコル、過去の経験、特定の装置、サンプルに応じて修正/最適化をご検討ください。
- マグネットにビーズを完全に集めるのに必要な時間は、プレート/チューブ、溶体量、試料粘度、使用するマグネットの条件に依存します。上清の除去や移送の際に、ビーズと一緒に吸って廃棄または移動させたりしないように注意してください。ビーズをマグネットへ集める時間は、各条件に応じて最適化してください。
- エタノールは大気中の水分を取り込むため、80%エタノールは用事調製するようにしてください。
- ビーズ洗浄に使用される80%エタノールの量は、プレートやチューブの体積、ピペティング可能な容量によって調製しても問題ありませんが、ビーズが洗浄工程中に完全に浸漬されることが重要となります。可能であれば、サンプル + KAPAハイパーピュアビーズと等量のエタノールで洗浄してください。
- 次のステップへ進める前に、エタノールを完全に除去することが重要ですが、ビーズが過剰に乾燥すると再懸濁が困難になり、DNA収量が著しく減少することがあります。ビーズを室温で3~5分間乾燥させれば十分にエタノールを除去できます。37°Cでビーズを乾燥させることは避けてください。
- 必要に応じて、溶出バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0~8.5) でDNAを溶出してください。PCRグレード水などの緩衝効果のない溶液中ではDNAが不安定なため、推奨しません。その後の用途やプロトコル (例えば、プローブハイブリダイゼーションの前にDNAの乾燥を必要とするハイブリダイゼーションターゲットキャプチャー) では、PCRグレード水での (精製DNAの) 溶出と保存が必

要となる場合があります。必ず、DNAが回収される容積 (溶出容積) が溶出時のビーズを完全に浸すのに十分な量であることを確認してください。

- 溶出緩衝液中の精製DNAは、2~8°Cで1~2週間、または-15~-25°Cで少なくとも1か月間は安定して保存可能です。-20°CでのライブラリーDNAの長期安定性は、ライブラリー濃度を含む多くの因子に依存します。長期保存には必ずDNA低吸着チューブを使用し、過度の凍結融解を避けてください

DNA精製 (クリーンアップ)

- 以下の注意事項は、二本鎖DNAの精製 (クリーンアップ)、濃縮、またはバッファー交換の一般的なプロトコルに適用されます。
- ゲノムDNAやNGSライブラリー構築のための断片化DNA、PCRまたはqPCR産物の、精製、バッファー交換、濃縮工程での回収率を最大化するためには、サンプルの品質に関係なくビーズをサンプル液量の3倍量用いることが推奨されます。これより低い比率で用いると、短いDNA断片の収率が低くなる可能性があります。
- NGSライブラリー作成プロトコルの特定のステップでは、回収率を上げるために精製時に用いるビーズの容量を増やすことがありますが、この結果、短いDNA断片がビーズに保持される可能性があります。
- 特定の目的のDNAサイズより短いDNAを意図的に除外するためにDNA精製を行うこともできます。回収されるDNAのフラグメントサイズはDNAサンプルに添加されたビーズ量に依存します。より小さいDNAフラグメントの回収率を上げるためには、DNAに対するビーズ量 (比率) を増やしてください。
- NGSライブラリー作成に用いるDNAのインプットが十分にあり特定のサイズセレクション法を用いる代わりとして本キットで小さいDNA断片を除去する場合、ビーズ量 (DNAサンプルに対するビーズの比率) を減らした精製反応を1-2回行うことも検討ください。

NGSワークフローにおけるサイズセレクション

- サイズセレクションの必要性はNGSアプリケーションごとに大きく異なります。実施するアプリケーションの種類、サンプルタイプ、添加するDNAとライブラリー調製の機序に応じて、ライブラリー調製工程中の以下のポイントでサイズセレクションを行うことが可能です。
 - DNAの断片化後
 - 様々な酵素反応後
 - ライゲーション反応後の精製時
 - ライブラリーの増幅後
- ビーズによるサイズセレクションはビーズとサンプルの容積比を利用して行われます。2回のサイズカットを行う「ダブルサイドサイズセレクション」では、1回目のサイズセレクションでDNAの上限サイズが決定され、2回目のサイズセレクションでDNAの下限サイズが決定されます。
- 回収するDNA断片サイズの上限を大きくするには、最初のサイズセレクションに使用するビーズ量を減らし、サイズ上限を小さくするためには、1回目のサイズセレクションでビーズ量を増やしてください（表1）。
- 回収するDNA断片サイズの下限を大きくするには、2回目のサイズセレクションで加えるビーズ量を減らし、サイズ下限を小さくするためには2回目のサイズセレクションでビーズ量を増やしてください（表1）。

表1: サイズ選択パラメーターの修正に関するガイドライン

DNA サイズの上限	修正方針
大きくする場合	1 回目のビーズ使用量を減らす
小さくする場合	1 回目のビーズ使用量を増やす
DNA サイズの下限	修正方針
大きくする場合	2 回目のビーズ使用量を減らす
小さくする場合	2 回目のビーズ使用量を増やす

- 2回目のサイズセレクションは、最低でもサンプル容量に対して0.2倍容量のビーズを使用してください。2回目のサイズセレクションに必要なビーズ容量は、1回目のサイズセレクション時に移した、DNAを含む上清の容量に対してではなく、サイズセレクション開始時のサンプルの容量に対して計算する点にご注意ください。詳しくはp.7からのNGSにおけるサイズセレクションのプロトコールをご確認ください。
 仮に1回目と2回目のサイズセレクション時に用いるビーズ容量の比が0.2倍容量以下で実施した場合、DNA回収率が著しく低下する可能性があります。
 また、回収されるDNA量を増やすために2回目のサイズセレクションに0.2倍容量以上のビーズも使用可能ですが、より小さなライブラリー断片が回収されるため、想定より広いサイズ分布のDNAサンプルが得られる可能性があることにご注意ください。

- サイズセレクションではサンプルのロスが発生し、80%以上の劇的な損失が起こる場合もございます。この結果、PCRフリーワークフローでの最終ライブラリー濃度に重大な影響を及ぼしたり、ターゲットキャプチャーやシーケンスに十分な量を調製するためにPCRサイクル数を増加させる必要が生じたりする可能性があります。特に使用可能なDNAインプット量が限られている場合は、サイズセレクションによって得られるメリットとライブラリーの複雑性が損なわれるデメリットを比較して検討する必要があります。
- ライブラリー調製プロセスの初めの方での標準的または改変された精製ステップで、不要なフラグメントは除去される、または除去される可能性があるため、シングルサイドのクリーンアップで十分な場合があります。
- NGSライブラリーのサイズセレクションは、本文書の範囲外の様々な要因に影響を受けます。いかなるサイズセレクションプロトコールも、貴重なサンプルを使用になる前に必ず最適化条件をご検討の上で使用ください。

プロトコール

1. ゲノムDNA精製 (クリーンアップ)

NGSライブラリー作成にあたり、事前にゲノムDNAの精製を行うことは有益です。ライブラリー作成前の高品質ゲノムDNAの精製、バッファー交換、および濃縮に、本ビーズはサンプルDNAの3倍量が推奨されます。

以下の詳細なプロトコールは、100 µL中のゲノムDNAの精製法の一例です。

精製に使用するプレート/チューブにDNAサンプルと適切な容量の本ビーズを加えた液量が入ること、お持ちのマグネットに対応していることを、確認してください。

- 1.1 開始前に、本ビーズが室温に平衡化されていること、完全に再懸濁されていることを確認する。
- 1.2 100 µLのゲノムDNAサンプルに本ビーズ 300 µLを加える。
- 1.3 ボルテックス又はピペティングで十分に混合する。
- 1.4 プレート/チューブを室温で5分間インキュベートし、ビーズにDNAを結合させる。
- 1.5 プレート/チューブをマグネット上に置いてビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。
- 1.6 上清を慎重に取り除き、廃棄する。
- 1.7 マグネット上に設置した状態のプレート/チューブに200 µLの80%エタノールを加える。
- 1.8 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。
- 1.9 加えたエタノールを慎重に取り除き、廃棄する。
- 1.10 マグネット上に静置した状態のプレート/チューブに200 µLの80%エタノールを加える。
- 1.11 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。
- 1.12 加えたエタノールを慎重に取り除き、廃棄する。この時、ビーズをマグネット側に集めたまま、残留するエタノールをすべて取り除くようにする。
- 1.13 室温で3~5分間、又はエタノールがすべて蒸発するまでビーズを乾燥させる。
注意：ビーズを過剰に乾燥させると、収量が低下するおそれがあります。
- 1.14 プレート/チューブをマグネットから外す。

- 1.15 適量の溶出バッファーでビーズを再懸濁する。溶出バッファーは、10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) またはPCRグレード水のいずれかをその後の操作に合わせて選択する。
- 1.16 プレート/チューブを2分間インキュベートし、ビーズからDNAを溶出する。
- 1.17 プレート/チューブをマグネット上に置いてビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。
- 1.18 透明な上清を新しいプレート/チューブに移し、その後の操作に使用する。
※このDNAは2~8℃で1~2週間、または-15~-25℃で最低1か月間保存可能。

RNA精製 (クリーンアップ) に関する諸注意

本キットは、RNA濃縮/RNAライブラリー作成に使用する前のRNAの精製にも使用可能であることが確認されています。例えば、トータルRNA中に阻害物質が含まれる場合、rRNAまたはグロビンmRNA除去の効率を下げる可能性があり、精製が有効です。阻害物質の存在が疑われる場合は、事前にサンプルに対して3倍量のビーズを用いた精製を行うことが可能です。

「ゲノムDNA精製」に概説されているプロトコールに従った精製を行いますが、以下の点を変更してください。

- 精製したRNAの溶出の際には、RNase freeの水で溶出してください。
- RNAを含むサンプルを混合する際は、ピペットを用いて穏やかに十分に混ぜるようにしてください。

2. NGSワークフローにおける断片化DNAの精製

NGSライブラリー作成において、適切なビーズ/サンプル比は精製が実施される作業工程（例えばフラグメンテーション、アダプターライゲーション、ライブラリー増幅後）や、除去・保持したいフラグメントサイズによって異なります。本キットはNGSライブラリー調製ワークフローの様々な段階におけるDNAフラグメントの効果的な精製に使用可能です。

回収されるDNAフラグメントのサイズ範囲は、DNAサンプルと、添加されたKAPAハイパーピュアビーズの容積（比）に依存します。断片化DNA、NGSライブラリー、およびアンプリコンにおける保持したいフラグメント長に基づく推奨の比率は、表2（および図1）をもとに決定してください。

以下のプロトコールは100 µLの断片化DNAサンプルの0.8X量による精製例です。

- 2.1 開始前に、本ビーズが室温に平衡化されていること、完全に再懸濁されていることを確認する。
- 2.2 100 µLの断片化DNAサンプルに本ビーズ 80 µLを加える。
- 2.3 ボルテックス又はピペティングで十分に混合する。
- 2.4 プレート/チューブを室温で5分間インキュベートし、ビーズにDNAを結合させる。
- 2.5 プレート/チューブをマグネット上に置いてビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。
- 2.6 上清を慎重に取り除き、廃棄する。
- 2.7 プレート/チューブをマグネット上に静置した状態で、200 µLの80%エタノールを加える。
- 2.8 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。
- 2.9 加えたエタノールを慎重に取り除き、廃棄する。
- 2.10 プレート/チューブをマグネット上に静置した状態で、200 µLの80%エタノールを加える。
- 2.11 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。
- 2.12 加えたエタノールを慎重に取り除き、廃棄する。この時ビーズをマグネット側に集めたまま、残留するエタノールをできるだけ全て取り除くようにする。
- 2.13 室温で3～5分間、又はエタノールがすべて蒸発するまでビーズを乾燥させる。
注意：ビーズを過剰に乾燥させると、収量が低下するおそれがあります。

- 2.14 プレート/チューブをマグネットから外す。
- 2.15 適量の溶出バッファーでビーズを再懸濁する。適切な溶出バッファーは、10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) またはPCRグレード水のいずれかでよいが、その後の操作に合わせて選択する。
- 2.16 プレート/チューブを2分間インキュベートし、ビーズからDNAを溶出する。
- 2.17 プレート/チューブをマグネット上に静置してビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。
- 2.18 透明な上清を新しいプレート/チューブに移し、その後の操作に使用する。
 ※このDNAは2～8℃で1～2週間、または-15～-25℃で最低1か月間保存可能。

表2：KAPAハイパーピュアビーズによる断片化DNA、NGSライブラリー、アンプリコンの精製ガイドライン

ビーズに保持されるフラグメント長	サンプル容量に対する推奨されるビーズ容量
≥ 600 bp	0.5 倍
≥ 400 bp	0.6 倍
≥ 300 bp	0.7 倍または 0.8 倍
≥ 200 bp	0.9 倍
≥ 150 bp	1.5 倍
≥ 100 bp	2.2 倍 – 3 倍

3. NGSにおけるサイズセレクション

サイズセレクションにおける条件は、シーケンズ解析方法によって大きく異なります。本キットは、ほとんどのDNAライブラリー調製ワークフローに組み込み可能で、ライブラリー作成過程の様々なポイント（断片化後、ライゲーション後の精製、ライブラリー増幅後）でサイズセレクションが可能です。

表3で本キットによるIlluminaライブラリーのサイズ選択のガイドラインを、そして図2でサイズセレクションされたDNAおよびライブラリーの代表的な精製結果を確認できます。これらのパラメータはあくまで指標であり、さらなる最適化が必要となる場合があります。

以下の詳細なプロトコールは、50 µL容積中でアダプターライゲーション済みのライブラリーを用いたサイズセレクションの一例です。表3に従って、サンプル量に対して0.6倍-0.8倍容量のビーズを用いたサイズセレクションを行い、最終的な平均ライブラリーサイズは400 bpを目標としています。最初の0.6倍量で600 bp以上のライブラリーを排除するようにセレクションされます。さらに0.2倍容量のビーズを加えて、300 bp以上（600 bp未満）のすべての分子をビーズに結合させ、300 bp未満のDNA断片をビーズ洗浄中に上清とともに廃棄します。

- | | |
|---|--|
| <p>3.1 本キットが室温に平衡化されていること、ビーズが進む前に完全に再懸濁されていることを確認してから操作を始める。</p> <p>3.2 アダプターライゲーションしたライブラリー50 µLに、30 µLのビーズを加え、1回目のサイズセレクション（0.6倍容量による、大きなライブラリー断片の除去）を行う。</p> <p>3.3 ボルテックス又はピペッティングで十分に混合する。</p> <p>3.4 プレート/チューブを室温で5分間インキュベートして、大きなライブラリー分子（600 bp以上）をビーズに結合させる。</p> <p>3.5 プレート/チューブをマグネット上に静置してビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。</p> <p>3.6 より小さなライブラリー分子（600 bp以下）を含む上清を新しいプレート/チューブに注意深く移す。<u>上清と共にビーズを吸わないように注意する。</u></p> <p>3.7 約600 bpより大きいライブラリー断片が結合しているビーズを含むプレート/チューブは廃棄する。</p> <p>3.8 上清に10 µLのビーズを加えて、2回目のサイズカット（0.8倍容量）を行う。この時に加えるビーズ容量は、元のサンプル容量である50 µLに対して計算する。
(0.8 - 0.6) × 50 µL = 10 µL</p> <p>3.9 ボルテックス又はピペッティングで十分に混合する。</p> <p>3.10 ビーズに300 bp以上のライブラリー分子が結合するように、プレート/チューブを室温で5～15分間インキュベートする。</p> | <p>3.11 プレート/チューブをマグネット上に静置して、ビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。300 bp未満のライブラリー断片を含む上清は注意深く取り除き、廃棄する。</p> <p>3.12 プレート/チューブをマグネット上に静置した状態で、200 µLの80%エタノールを加える。</p> <p>3.13 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。</p> <p>3.14 加えたエタノールを慎重に取り除き、廃棄する。</p> <p>3.15 マグネット上に設置した状態のプレート/チューブに200 µLの80%エタノールを加える。</p> <p>3.16 プレート/チューブをマグネット上に静置したまま、室温で30秒以上インキュベートする。</p> <p>3.17 加えたエタノールは慎重に取り除き、廃棄する。ビーズをマグネット側に集めたまま、残留するエタノールをすべて取り除くようにする。</p> <p>3.18 ビーズを室温で3～5分間、又はエタノールがすべて蒸発するまで乾燥させる。
<u>注意：ビーズを過剰に乾燥させると、収量が低下するおそれがあります。</u></p> <p>3.19 プレート/チューブをマグネットから外す。</p> <p>3.20 適量の溶出バッファーでビーズを再懸濁する。適切な溶出バッファーは、10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) またはPCRグレードの水のいずれかであるが、その後の操作に合わせて選択する。</p> <p>3.21 プレート/チューブを2分間インキュベートし、ビーズからDNAを溶出する。</p> <p>3.22 プレート/チューブをマグネット上に置いてビーズをマグネット側に集め、液が透明になるまでインキュベートする。</p> <p>3.23 透明な上清を新しいプレート/チューブに移し、その後の操作に使用する。
※このDNAは2～8℃で1～2週間、または-15～-25℃で最低1か月間保存可能。</p> |
|---|--|

表3: KAPAハイパーピュアビーズによるサイズ選択のガイドライン

精製する DNA の種類	サンプル容量に対する KAPA ハイパーピュアビーズの使用比率と得られるフラグメントサイズ ^{1,2}			
	0.8 倍 - 1.0 倍	0.7 倍 - 0.9 倍	0.6 倍 - 0.8 倍	0.5 倍 - 0.7 倍
断片化 dsDNA ³	150 – 350 bp	200 – 400 bp	250 – 550 bp	300 – 1000 bp
平均フラグメントサイズ ³	250 bp	300 bp	350 bp	500 bp
アダプターライゲーション済ライブラリー ^{4,5}	200 – 400 bp	250 – 500 bp	300 – 600 bp	350 – 1200 bp
平均フラグメントサイズ	300 bp	350 bp	400 bp	550 bp
増幅後ライブラリー	200 – 400 bp	250 – 500 bp	300 – 600 bp	350 – 1200 bp
平均フラグメントサイズ	300 bp	350 bp	400 bp	525 bp

1. Covaris E220 Focused Ultrasonicatorを用いて高品質なヒトゲノムDNAを、250~400 bpの範囲で断片長がピークトップを生じるよう最適化した条件を用いて断片化されています。
2. これらのサイズセレクションの範囲はKAPAユニークデュアルインデックスアダプターで調製したライブラリーに対して最適化されています。シングルインデックスアダプターや、より短いまたは特注アダプターデザインで調製したライブラリーに対しては、条件の再検討をしてください。
3. 報告されているサイズ範囲は、ライブラリー調製前の「断片化したDNA」のサイズを指します。アダプターライゲーション後、ライブラリーサイズは約120 bp長くなります。
4. ライゲーション後にサイズセレクションを行う場合、KAPA ライゲーションバッファーには高濃度のPEG 6000を含む為、ライゲーション後の精製を少なくとも1回行ってください。PEG 6000を除去しないとサイズセレクションに支障がでることがあります。
5. 報告されているサイズ範囲は「アダプター結合済ライブラリー」のサイズを指します。アダプター結合はDNA断片の長さを増加させます。作成済みのライブラリーで目的のサイズ分布を得るためには、断片化後とは異なり、ライゲーション後またはライブラリー増幅後に1回目のサイズセレクション時に用いるビーズ容量比を最適化する必要があります。

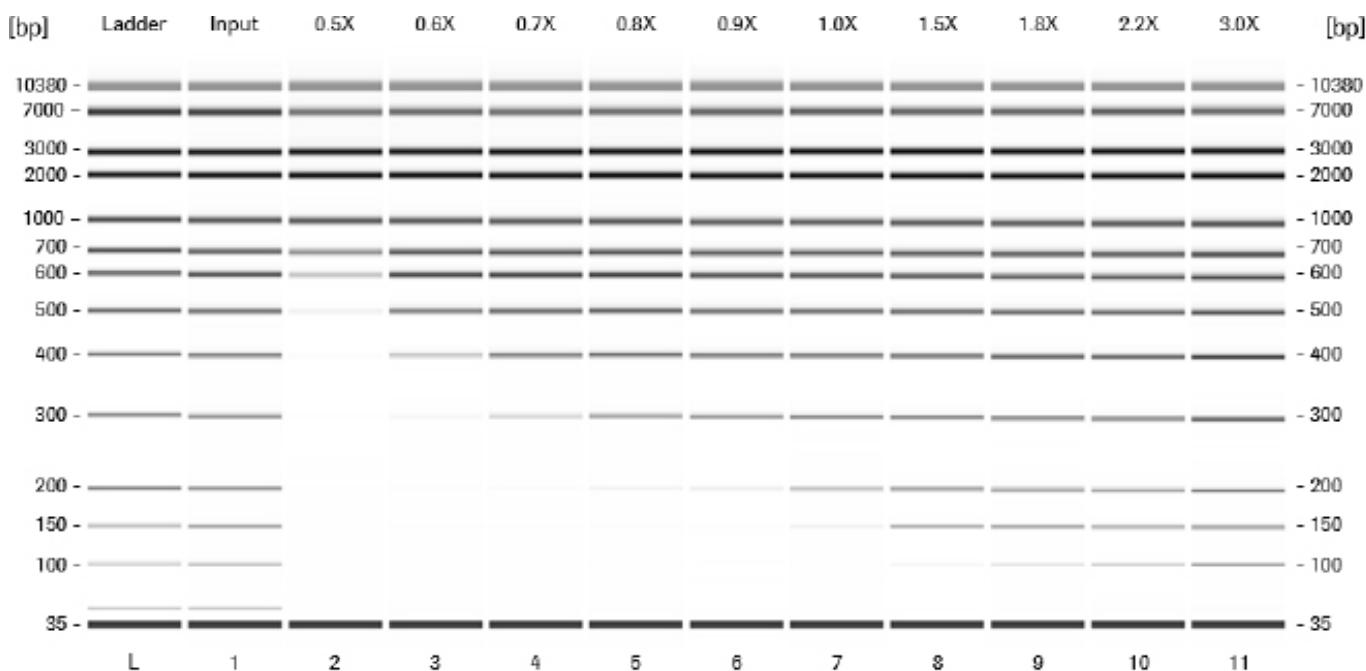


図1.dsDNAフラグメントの回収におけるKAPAハイパーピュアビーズとサンプル容量比の関係

35 bpから10 kbの範囲のdsDNAフラグメントの混合物を、様々な比率の本ビーズで処理し、DNAフラグメントサイズ保持に対する影響をAgilent バイオアナライザー2100 High Sensitivity DNAキットで評価しました。保持されたDNAフラグメント長は、ビーズ/サンプル比に反比例しています。つまり、より低分子のフラグメントを保持するためには、より多量または高比率でビーズが必要です。

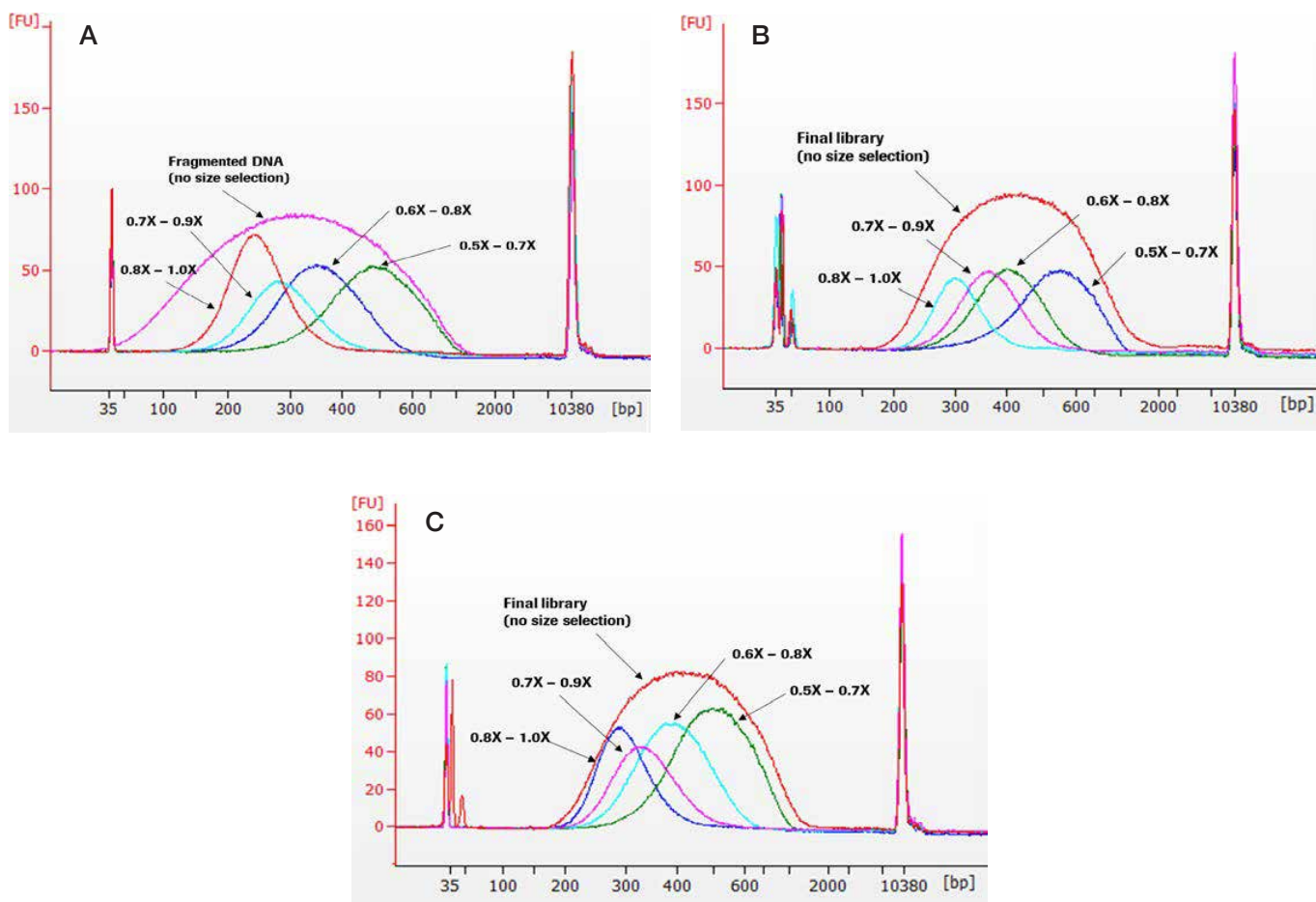


図2.KAPA ハイパーピュアビーズを用いてサイズセレクションを行った断片化DNAおよびNGSライブラリーの精製例

- A. 異なる条件 (表2) でサイズセレクションした断片化DNAのサイズ分布。DNAはCovaris E220 Focused Ultrasonicatorを用いて機械的に断片化しました。
- B. サイズセレクション未実施の増幅済ライブラリーと、ライゲーション後に様々なビーズ容量比 (表2) でサイズセレクションを行ったライブラリーのサイズ分布。
- C. サイズセレクション未実施の増幅済ライブラリーと、増幅後に様々なビーズ容量比 (表2) でサイズセレクションを行ったライブラリーのサイズ分布。

全てのライブラリーは、モードフラグメント長が250~400 bpとなるよう最適化された条件でCovaris E220 Focused Ultrasonicatorを用いて機械的に断片化した100 ngのヒトゲノムDNAを用い、KAPA HyperPrepキット、15 μM KAPA ユニークデュアルレインデックスアダプターを用いて調製されています。電気泳動はBioanalyzer 2100 High Sensivity DNA Kitで実施しました。DNA濃度は解析前にノーマライズ済みで、ライブラリー作成の各工程における実際の濃度は反映されていません。

付録 - トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	解決策
精製されたDNAの収量が低い。	ビーズ溶液が室温まで戻されていない。	KAPA ハイパーピュアビーズが室温に戻るまで十分な時間をおいてください。所要時間はビーズの容量によって異なります。
	ビーズ溶液が使用前に均一になっていない。	ビーズが完全に再懸濁するまで、穏やかにボルテックスしてください。
	反応に不適切な液量で精製を行っている。	<ul style="list-style-type: none"> ・ 精製やサイズセレクションの前にDNA溶液を10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) またはPCRグレードの水で希釈して、サンプル容量を増やしてください。 ・ 反応量がマグネットの性能に適合していることを確認してください。 ・ DNAを溶出する際、マグネット側に集めたビーズが完全に浸る量のバッファーを使用してください。
	サンプル/ビーズ溶液の混合が不足している。	少なくとも30秒間ボルテックスを行うか、少なくとも20回、ピペティングしてよく混合してください。
	ビーズへのDNAの結合が不足している。	DNA/ビーズ溶液を室温で少なくとも5分間インキュベートし、DNAがビーズに結合できるようにしてください。
	使用したエタノール濃度が80%未満になっている。	使用前に80%エタノールを毎回調製してください。
	洗浄工程でビーズを過剰に乾燥させている。	乾燥時間を短縮してください。また、37°C条件でビーズを乾燥させないでください。ビーズがひび割れた状態になるまで乾燥させないでください。
	溶出時に要する時間が不足している。	DNAがビーズから溶出するまで少なくとも2分間放置してください。
	キット保管条件が間違っている。	本ビーズは2~8°Cで遮光して保管してください。 -15~-25°Cで保管しないでください。
精製/サイズセレクション時のDNA溶液にビーズが混ざっている。	マグネットへのインキュベーション時間が不足している。	上清が完全に透明になるまでビーズをマグネット上に静置してください。プレートの種類、サンプル容量や粘度、およびマグネットにビーズが集められる時間に影響を及ぼす可能性があります。
	ピペットでの操作ミスがある。	溶液を移す際にはビーズを吸引しないように注意してください。
精製したDNAのサイズが想定しているサイズ分布とは異なる。	反応に用いられたビーズ量が適切ではない。	最初のサイズセレクション時に本ビーズが正しい容量や比率で使用されていることを確認してください。 2回目の精製時に必要な本ビーズの体積は、サイズセレクション開始時のDNA溶液の体積に対して計算されます。1回目の上清の容量ではありません。
	ライゲーション後の精製を行わずにサイズセレクションを行った。	KAPA Ligation Buffersには高濃度のPEG 6000が含まれており、ライゲーション後の精製を行わないとサイズセレクションに支障が出る場合があります。

制限および責任

本文書は現状のまま提供されており、Kapa Biosystems社は本文中のいかなる誤植、技術的な誤り、またはその他の不正確性に対して、一切の責任を負いません。Kapa Biosystems社は、本文中に含まれる情報を定期的に変更する権利を有していますが、この文書の変更、更新、補完、またはその他の情報の追加を、定期的にするを約束するものではありません。

Kapa Biosystems社は、本ユーザーガイドに記載される限定的な保証以外に、明示されているかに関わらず、いかなる表明、保証、条件または誓約（特定目的への適合性を明示するか否かの保証、条件、非侵害性、商品性、耐久性、権利、または本契約に言及される製品の性能もしくは不履行または本契約に言及されるサービスの履行に関連するものを含む、これらに限定されない事項）を行いません。

本文書には、第三者の情報源、ハードウェアまたはソフトウェア、製品、サービスおよび第三者のウェブサイト（まとめて「第三者情報」）への参照が含まれている場合がございます。Kapa Biosystems社は、第三者情報の内容、正確性、著作権の遵守、適合性、性能、信頼性、合法性、関係性、またはその他の側面を限定することなく含み、いかなる第三者情報に対しても責任を負いません。本文書に第三者情報を含めることは、第三者情報のKapa Biosystems社による第三者情報または第三者を何らかの形で保証を意味するものではありません。

Kapa Biosystems社は、本書に記載されるKapa Biosystems社製品の使用により、満足のいく結果が得られることを保証または表明するものではありません。お客様に提供される保証内容は、本ガイドにて限定的に保証されるもののみとなります。お客様はKapa Biosystems社製品の使用に関連するすべてのリスクは、お客様が負うものとなっております。

Kapa Biosystems社は、お客様がKapa Biosystems社製品の使用に関連して、Kapa Biosystems社が供給されないソフトウェアや機器の使用について責任を負うこととはございません。

購入者に対する注意：限定的な製品保証内容

製品規格書に記載されている性能基準に適合しない製品については、無料で交換を致します。この保証は、製品の交換に対する責任を制限するものとなります。その他の保証は明示されているか否かに問わず、商品や特定の目的に対する適合性などをKapa Biosystems社は保証いたしません。Kapa Biosystems社は本製品の仕様に起因する、直接的、間接的、結果的または偶発的に生じた障害に対して責任を持ちません。

購入者に対する注意：使用用途の限定

「KAPAハイパーピュアビーズ」は、研究目的のみで開発、設計、販売をされております。製品や、製品に含まれる成分も、診断薬や医薬品開発に使用するための検査は行われておらず、ヒトや動物への投与にも適しておりません。詳細は入手可能なSDSをご確認ください。

KAPA はロシユの商標です。その他の全ての製品名および商標はそれぞれの所有者に帰属します。

本資料は、KAPA Biosystems 社作成の「KAPA HyperPure Beads Technical Data Sheet KR1705-v2.20」を元に、日本ジェネティクス株式会社が日本語訳を行い、作成した資料となります。

最新の情報および、製品プロトコールにつきましては、製品に添付、または製品ページにございます最新版の英文マニュアルをご参照ください。



日本ジェネティクス株式会社

<https://www.n-genetics.com> info@genetics-n.co.jp

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階 TEL 03 (3813) 0961 FAX 03 (3813) 0962

本製品はライフサイエンス分野における研究での使用を目的としています。仕様は2021年7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。

M0156