

NGSライブラリ調製試薬

KAPA EvoPlus V2 Kit

Cat.No. 9420037001, 9420053001, 9420339001, 9420045001,
9420304001, 9420371001, 9420428001, 9420436001

取扱説明書 Ver.202607

第1章 始める前に	3
コンポーネント.....	3
アプリケーション.....	3
図1a - KAPA EvoPlus V2クイックガイド：KAPA UDI Adapterを使用したライブラリ準備.....	4
図1b - KAPA EvoPlus V2クイックガイド：KAPA Universal Adapter を使用したライブラリ準備.....	5
プロトコル情報と安全性.....	6
用語.....	6
必要な機器、実験器具、消耗品.....	7
第2章 試薬の保管と準備	8
ステップ 1. 試薬キットの保管条件	8
ステップ 2. KAPA AdapterとKAPA UDI Primer Mixesの準備.....	8
第3章 サンプルライブラリの準備.....	10
サンプル要件.....	10
ステップ 1. 断片化とAテーリング.....	11
ステップ 2. アダプターライゲーション	12
ステップ 3. KAPA HyperPure Beadsによるサンプルライブラリの精製.....	12
第4章 サンプルライブラリの増幅.....	14
ステップ 1. ライブラリ増幅反応の準備.....	14
ステップ 2. ライブラリ増幅の実行.....	15
ステップ 3. KAPA HyperPure Beadsによる増幅サンプルライブラリの精製.....	15
第5章 品質管理	18
定量.....	18
サイズ確認.....	18
付録.....	19
付録A. ダブルサイドサイズセレクション	19
付録B. トラブルシューティング	21

第1章 始める前に

本使用説明書は、イルミナシーケンシング用のライブラリを迅速に調製するための、合理化されたDNA断片化およびライブラリ構築プロトコルのプロセスについて説明します。

コンポーネント

型番	コンポーネント型番	製品名	容量
09420037001 09420045001 *		KAPA EvoPlus V2 Kit (24反応)	
	09420606001	KAPA FragTail ReadyMix	600 µL
	10119942001	KAPA Ligation ReadyMix	240 µL
	08203075001	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	690 µL
09420053001 09420304001 *		KAPA EvoPlus V2 Kit (96 反応)	
	09420614001	KAPA FragTail ReadyMix	2.4 mL
	10119969001	KAPA Ligation ReadyMix	960 µL
	08203008001	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	3.0 mL
09420339001 09420371001 *		KAPA EvoPlus V2 Kit (384 反応)	
	09420649001	KAPA FragTail ReadyMix	9.6 mL
	10119985001	KAPA Ligation ReadyMix	3.84 mL
	09420711001	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	9.6 mL
09420428001 09420436001 *		KAPA EvoPlus V2 Kit (96 ウェル プレート**)	
	09420657001	KAPA FragTail ReadyMix	96×25 µL
	10119993001	KAPA Ligation ReadyMix	96×10 µL
	09420720001	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	96×25 µL
		プレート1枚につき交換用シール (穴あけ・剥がし可能) 1枚	

* PCR フリーのワークフロー用のキットでは、ライブラリ増幅試薬 (KAPA HiFi HotStart ReadyMix) は含まれていません。

** KAPA EvoPlus V2 Kit (96 ウェル プレート) には 10% + 5 µL が余剰として分注されています。


注意: アクセサリーキット (KAPA HyperPure Beads, KAPA Universal Adapter & KAPA UDI Primer Mixes, KAPA Unique Dual-Indexed Adapter, KAPA Library Amplification Primer Mix) は別売りです。

アプリケーション

KAPA EvoPlus V2 Kitは、DNA断片化、Aテーリング、アダプターライゲーション、そしてライブラリ増幅 (オプション)を必要とする、低スループットおよび高スループットの次世代シーケンシング (NGS)ライブラリ構築ワークフローに最適です。キットは、幅広いサンプルタイプとインプット量 (0.1 ng ~ 500 ng)からライブラリを構築できるように設計されており、ゲノムDNAだけでなく、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET)サンプルから抽出された低品質DNAにも対応しています。

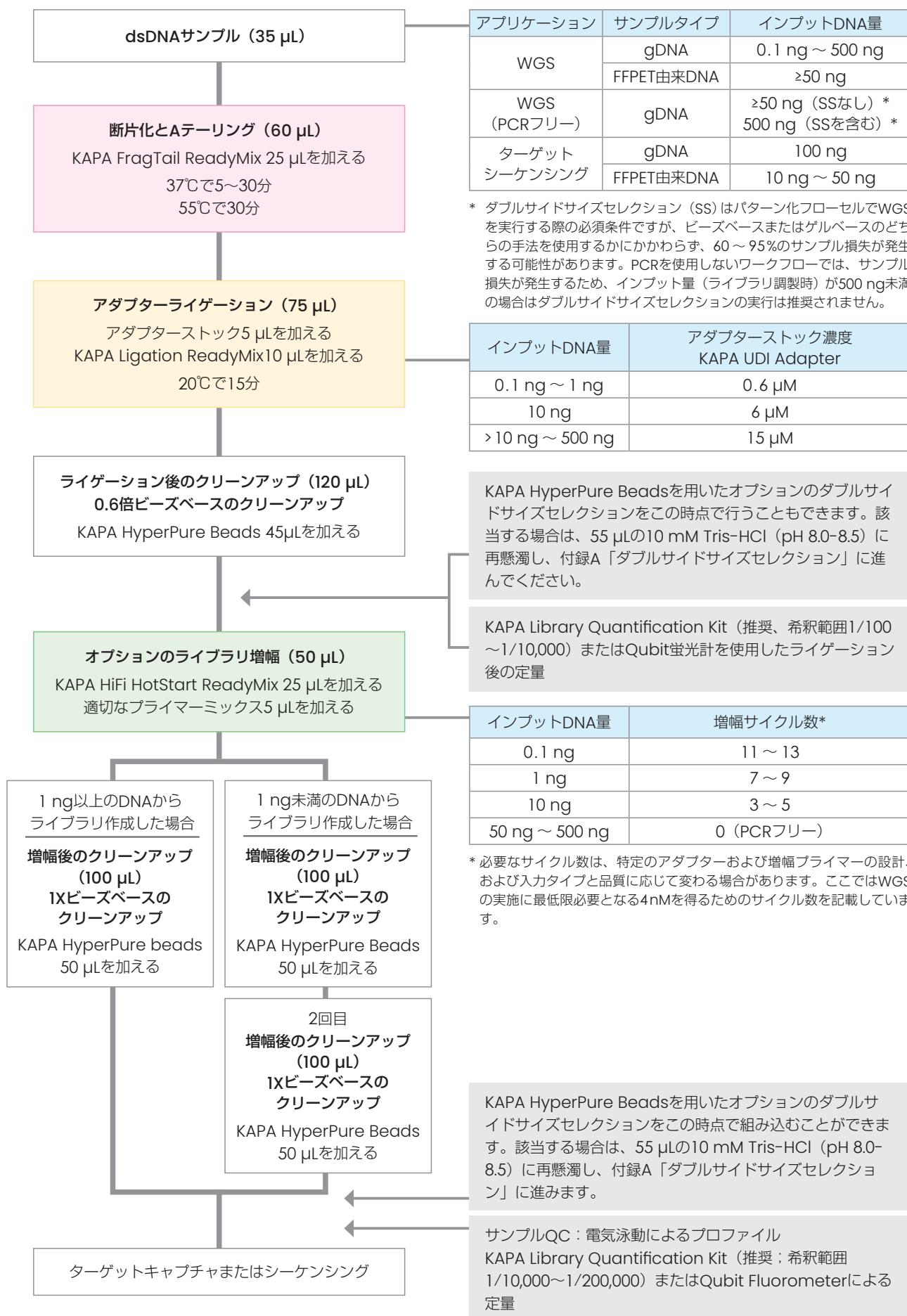
このキットは、生殖細胞系および体細胞系の変異検出に最適です。自動化にも適しており、以下のワークフローアプリケーションに使用できます。

- 全ゲノム配列解析 (WGS)
- ハイブリダイゼーションキャプチャ法を使用した全エクソーム (WES) またはターゲットシーケンス

 KAPA EvoPlus V2 Kitには、メチル化Seqアプリケーションでの使用が検証されていない酵素断片化モジュールが含まれています。酵素断片化モジュールはDNA修復機構に関与しており、メチル化パターンに影響を及ぼす可能性があります。

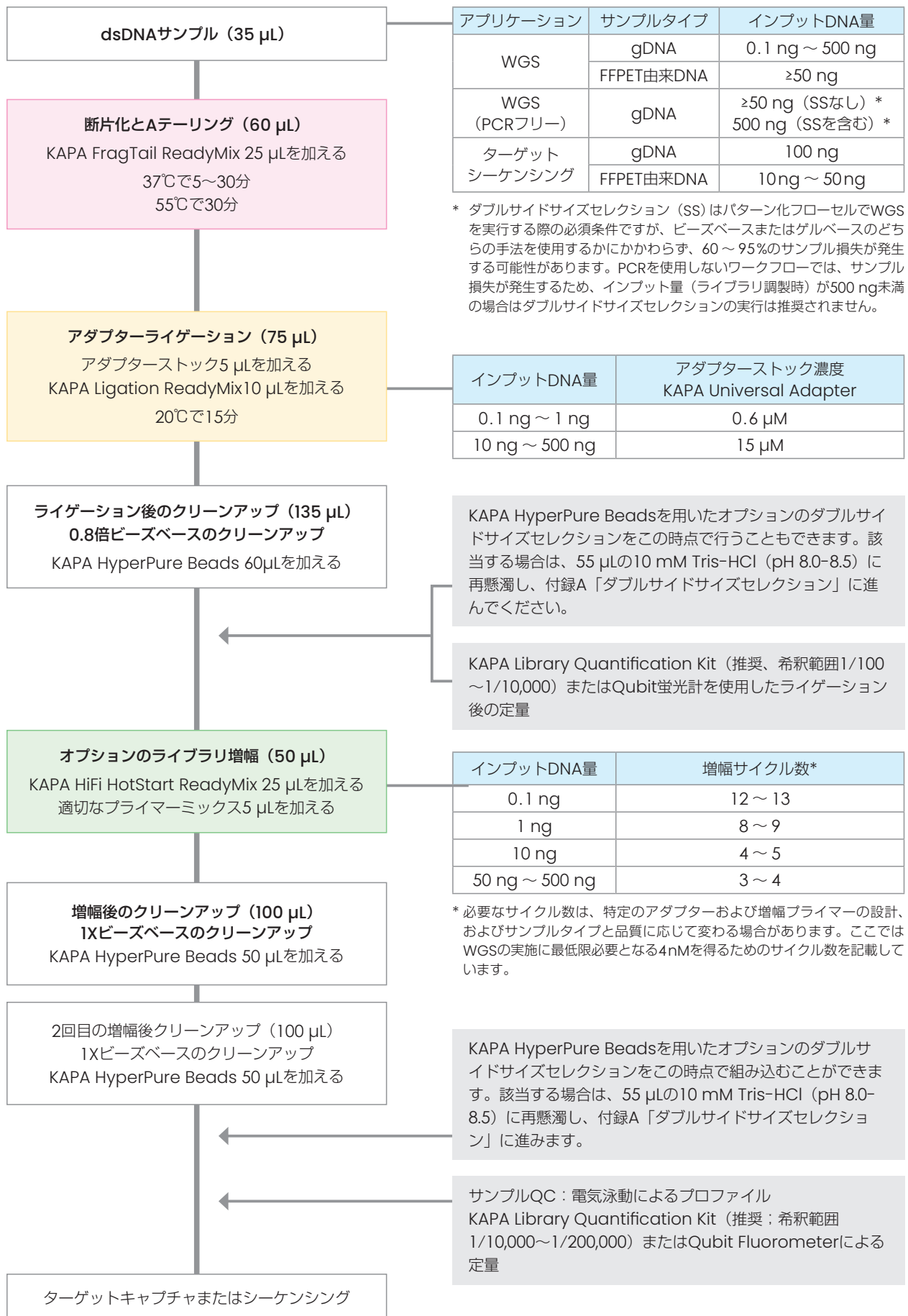
KAPA EvoPlus V2クイックガイド：

KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kitを使用したライブラリ準備



KAPA EvoPlus V2クイックガイド：

ライブラリの準備 KAPA Universal Adapter と KAPA UDI Primer Mixesを使用したライブラリ準備



プロトコル情報と安全性

- 手袋を着用し、サンプルの汚染を防ぐための予防措置を講じてください。
- すべての遠心分離は室温（15℃ ～ 25℃）で実行してください。
- 特に指定がない限り、「十分に混合する」と記載されているすべての混合手順では10秒間以上ボルテックスで攪拌してください。
- 混合後にチューブのキャップ内に液体が付着している場合は、サンプルを軽くたたか、軽く遠心分離して液体をチューブの底に集めてください。次のステップに進む前に、混合物が均一であることを確認してください。

用語

サンプルライブラリ：DNA の断片化とライゲーションによって生成された、初期のショットガンライブラリ

増幅されたサンプルライブラリ：PCR による増幅後のサンプルライブラリ

KAPA UDI Adapter：KAPA Unique Dual-Indexed Adapterの略。KAPA 独自のデュアルインデックス 付きのアダプター

KAPA UDI Primer Mixes：KAPA 独自のデュアル インデックスを含む プライマー ミックス

KAPA Universal Adapter：シーケンシングモチーフのサブセットを含むTruncatedタイプのアダプター。KAPA UDI Primer Mixesと組み合わせて使用

必要な機器、実験器具、消耗品

本プロトコルでは、指定された機器、実験器具、消耗品を使用します。以下に記載されている機器、実験器具、消耗品はご自身の責任においてご使用ください。

実験装置

装置
マグネットスタンド
マイクロ遠心分離機 (16,000 x g対応)
Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific)
電気泳動装置および関連アッセイと試薬
サーマルサイクラー
ボルテックスミキサー
プレート遠心分離機 (280 xg以上)

ライブラリ調製関連試薬

製品名	容量	型番
KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms	-	-
KAPA HyperPure Beads	5 mL	08963835001
	30 mL	08963843001
	60 mL	08963851001
	4×60 mL	08963878001
	450 mL	08963860001
KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit (KAPA UDI Adapter)	96 x 20 µL	08861919702
KAPA Library Amplification Primer Mix	250反応 (1.25 mL)	07958994001
KAPA Library Amplification Primer Mix	384反応 (1.92 mL)	09420410001
KAPA Library Amplification Primer Mix, 96-well plate	96×5 µL	09420479001
KAPA Universal Adapter	96反応	09063781001
	384反応*	09063790001
KAPA UDI Primer Mixes 1 – 96	96反応	09134336001
KAPA UDI Primer Mixes 97 – 192	96反応	09329838001
KAPA UDI Primer Mixes 193 – 288	96反応	09329846001
KAPA UDI Primer Mixes 289 – 384	96反応	09329854001

* 仮想キット - 4 x 96反応キットで構成

その他消耗品

成分
10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)
無水エタノール, 分子生物学グレード
Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific)
Qubit Assay Tube (ThermoFisher Scientific)
低結合チューブ:
• 0.2 mL PCRチューブ
• 1.5 mLマイクロ遠心チューブ (オプション)
ヌクレアーゼフリーのPCRグレード水

第2章 試薬の保管と準備

ステップ1. 試薬キットの保管条件

試薬キット	保管温度
KAPA EvoPlus V2 Kit	-15°C ~ -25°C
KAPA HyperPure Beads*	2°C ~ 8°C
KAPA UDI Adapter Kit	-15°C ~ -25°C
KAPA Universal Adapter	-15°C ~ -25°C
KAPA UDI Primer Mixes (未調製時)	2°C ~ 8°C
KAPA UDI Primer Mixes (再懸濁後)	-15°C ~ -25°C
KAPA Library Amplification Primer Mix	-15°C ~ -25°C







*KAPA HyperPure Beads キットは凍結しないでください。

ステップ2. KAPA AdapterとKAPA UDI Primer Mixesの準備



マルチプレックス化のガイドラインについては、KAPA UDI Adapter KitまたはKAPA UDI Primer Mixesの取扱説明書を参照してください。

ステップ2a. KAPA UDI Adapterの希釈 (必要な場合)

- KAPA UDI Adapter プレートを保管場所 (-15°C ~ -25°C) から取り出し、室温で解凍します。
- KAPA UDI Adapter プレートを室温で遠心分離 (280 x gで少なくとも1分間)、液体がウェルの底に集まるようにします。
 KAPA UDI Adapterのクロスコンタミネーションを引き起こす可能性があるため、アダプタープレートをボルテックスしないでください。使用前に個々のアダプターをピペットで混合してください。
- ホイルシールを取り外す前に、プレートが正しい向きになっていることを確認してください。
- 初めて使用する際は、クロスコンタミネーションを防ぐためにプレートのホイルシールを慎重に取り外します。
 元のホイルシールは廃棄してください。再利用しないでください。
 ホイルシールを剥がす際は、実験室における適切な手順を守ってください。例えば、シールの裏面に触れないようにしてください。接触した場合は、アダプターまたはサンプル プレートを扱う前に手袋を交換してください。
 クロスコンタミネーションを防ぐため、ウェルごとに新しいピペットチップを使用してください。KAPA UDI Adapter プレートの内容をすべて使用しない場合は、キットに付属の新しいホイルシールを貼ってください。ホイルシールが正しい位置で、96個のウェルすべてを完全に覆っていることを確認してください。ローラーなどの適切なツールを使用して、ホイルシールを均一に貼ってください。
- 該当する場合は、KAPA Adapter Dilution Bufferを使用して、アダプターを必要な濃度に希釈します (以下の表1を参照)。

ステップ2b. KAPA Universal Adaptersの希釈 (必要な場合)

- KAPA Universal Adapter チューブを保管場所 (-15°C ~ -25°C) から取り出し、室温または氷上で解凍します。
- 初めて使用する前によく混ぜてください。
- KAPA Universal Adapter を室温で遠心分離 (280 x gで少なくとも1分間) し、液体をチューブの底に集めます。
- 必要に応じて、KAPA Universal Adapter を10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) で必要な濃度に希釈します (以下の表1を参照)。

表1. 各インプットDNA量におけるアダプター濃度

インプットDNA量	KAPA UDI Adapter		KAPA Universal Adapter	
	アダプターストック濃度*	アダプター：インサートモル比**	アダプターストック濃度*	アダプター：インサートモル比**
500 ng	15 µM	20 : 1	15 µM	20 : 1
100 ng	15 µM	100 : 1	15 µM	100 : 1
50 ng	15 µM	200 : 1	15 µM	200 : 1
10 ng	6 µM	400 : 1	15 µM	1000 : 1
1 ng	0.6 µM	400 : 1	0.6 µM	400 : 1
0.1 ng	0.6 µM	4000 : 1	0.6 µM	4000 : 1

* KAPA UDI Adapterと KAPA Universal Adapterはどちらも 15 µM で提供されます。

** アダプター：インサートのモル比の計算は、モード DNA 断片長 200 bp に基づいており、DNA 断片が長い場合はより高くなり、モード サイズが 200 bp 未満に断片化された DNA の場合はわずかに低くなります。

ステップ2c. KAPA UDI Primer Mixesの準備

KAPA UDI Primer Mixesを使用する前に、次の手順に従ってプライマーを再懸濁してください。

1. KAPA UDI Primer Mixes プレートを保管場所 (2°C ~ 8°C) から取り出します。
2. KAPA UDI Primer Mixes プレートを室温で遠心分離し (280 x gで少なくとも 1 分間)、内容物がウェルの底にあることを確認します。
3. ホイルシールを取り外す前に、プレートの向きが正しいことを確認してください。ウェル位置A1を左上隅にするには、図2に示すように、切り欠きのある角が左下ユーザーの方を向いている必要があります。
4. クロスコンタミネーションに気をつけながら、プレートのホイルシールを慎重に取り外します。



元のホイルシールを破棄します。

5. マルチチャンネルピペットを使用して、ヌクレアーゼフリーのPCRグレード水10µLを各ウェルの底に直接加え、分注後はチップを捨ててください。



クロスコンタミネーションを防ぐため、ウェルごとに新しいピペットチップを使用してください。隣接するウェルへの液体の飛散を防ぐため、各ウェルの底までゆっくりと水を滴下してください。

6. 各ウェルにヌクレアーゼフリーのPCRグレード水10µLが入っていることを確認し、プレートを付属のホイルシールで覆います。



ホイルシールが正しい位置で、96個のウェルすべてを完全に覆っていることを確認してください。ズレ等があるとKAPA UDI Primer Mixes のクロスコンタミネーションの可能性がります。

7. ローラーまたは適切なツールを使用して、ホイルシールを均等に貼り付けてください。

8. 室温でプレートを遠心分離してください。(280 x gで少なくとも30秒間)

9. プレートを徹底的にボルテックスし、すべてのウェルがよく混ざっていることを確認します。



プレートを立てた状態でプレートの角をボルテックスで攪拌することで、プレートの隅のウェルもよく混ぜてください。

10. プレートを室温で遠心分離 (280 x gで少なくとも1分間)し、溶液をウェル底に集めてください。

11. KAPA UDI Primer Mixes プレートは、ライブラリ増幅ステップで使用する準備が整いました。

12. 溶解済みの未使用のKAPA UDI Primer Mixes は、-15°C ~ -25°Cで保管してください。凍結融解の繰り返しを避けるため、プライマーを別のチューブに移して保管することができます。

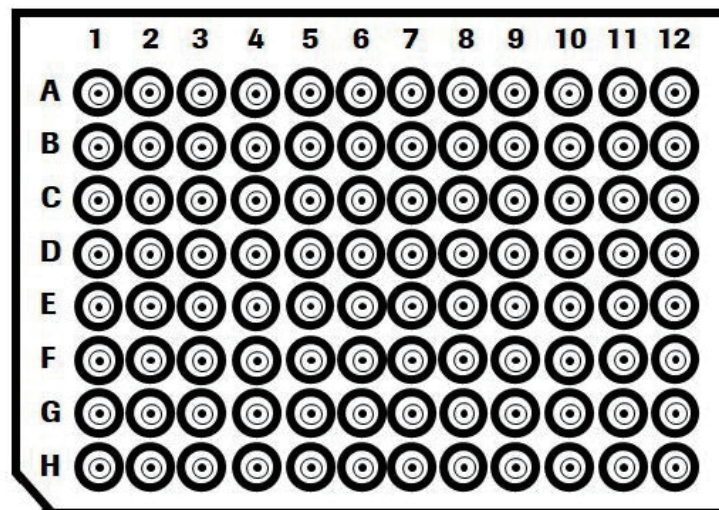


図 2 : KAPA UDI Primer Mixes プレートのレイアウト

第3章 サンプルライブラリの準備

この章では、KAPA EvoPlus V2Kitを用いて酵素断片化を行い、インデックスライブラリを調製します。このワークフローでは、以下のキットのコンポーネントを使用する必要があります。

- KAPA EvoPlus V2 Kit
- KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit & KAPA Library Amplification Primer Mix*
または KAPA Universal Adapter** & KAPA UDI Primer Mixes
- KAPA HyperPure Beads***

以下のものが利用可能であることを確認してください。

ヌクレアーゼフリー、PCRグレード水
新しく調製した80%エタノール
10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)

- * KAPA EvoPlus V2 Kitには、KAPA Unique Dual-Indexed (UDI) Adapterの使用が推奨されます。ただし、このキットはKAPA Universal Adapter & KAPA UDI Primer Mixes およびサードパーティサプライヤー製のFull-lengthタイプまたはTruncatedタイプのアダプターとも互換性があります。
- ** KAPA Universal UMI Adapter (カタログ番号: 09329862001、33 µMで提供)も、このワークフローでご検討いただけます。独自の分子バーコード (UMI) を備えたKAPA Universal UMI Adapterは、各サンプル内で分子バーコーディングを可能にし、低頻度変異検出のための適切な分子カウントを可能にします。ただし、KAPA Universal UMI Adapterは特定のKAPAターゲットエンリッチメントワークフロー内でのみ検証されており、非ターゲットエンリッチメントワークフロー (全ゲノムシーケンスなど) では同様のデータ解析上の利点を得られない可能性があります。
- *** KAPA EvoPlus V2 KitにはKAPA HyperPure Beadsの使用が推奨されます。ただし、キットはKAPA Pure Beadsにも対応しています。他のクリーンアップビーズをご使用の場合、DNA結合条件とサイズ選択が異なる場合があります。


サンプル要件







このワークフローは、0.1 ng ~ 500 ngの高品質gDNAを用いて検証されており、FFPETから抽出した50 ng以上の低品質DNAを用いたサンプルライブラリ調製にも適します。DNAの定量にはQubit dsDNA HS Assay Kitを使用してください。インプット量が少ない場合やサンプル品質が低い場合、同等の結果が得られない可能性があります。

表2. ライブラリ構築における推奨インプットDNA量

アプリケーション	サンプルタイプ	インプットDNA量
WGS	gDNA	0.1 ng ~ 500 ng
	FFPET由来DNA	≥50 ng
WGS (PCRフリー)	gDNA	≥50 ng (SSなし) * 500 ng (SSを含む) *
ターゲットシーケンシング	gDNA	100 ng
	FFPET由来DNA	≥10 ng ~ 50 ng

* ダブルサイドサイズセレクション (SS) はパターン化フローセルでWGSを実行する際の必須条件ですが、ビーズベースまたはゲルベースのどちらの手法を用いるかにかかわらず、60 ~ 95%のサンプル損失が発生する可能性があります。PCRを使用しないワークフローでは、サンプル損失が発生するため、500 ng未満のインプット量でダブルサイドサイズセレクションを実行することは推奨されません。


 ライブラリ調製ワークフローを成功させるには、KAPA EvoPlus V2 Kitのコンポーネントが使用前に完全に解凍され、十分に混合されていることを確認することが重要です。特に、FragTail ReadyMixとLigation ReadyMixは高濃度のPEG 6000および/またはグリセロールを含み、粘性が高いため、これらの溶液が十分に混合されていることを確認し、ピペティングには注意してください。少なくとも10回ピペットで混合するか10 ~ 20秒間ボルテックスで混合してください。FragTail ReadyMix 中に PEG 6000 の小さな液滴が見える場合があります。液滴が完全に再懸濁されるまで、ReadyMix を十分にボルテックスで撹拌してください。

-  取り扱い中および準備中は、すべての ReadyMix をできるだけ氷上に保管してください。
-  プレートフォーマットを使用する場合は、プレートを包装スリーブから取り出し、室温または適切な冷却試薬ブロック内で解凍します。完全に解凍したら、プレートをよくボルテックスし、室温で遠心分離（例えば280 x gで1分間）して、シールを穴あけまたは剥がす前に、すべての液体がウェルの底に集まるようにしてください。
-  プレートの各ウェルには、1反応に十分な ReadyMix と余剰分が含まれています。
-  96反応プレートの一部のみを使用する場合は、必要なウェルのホイルに穴を開けてください。使用後は、キットに付属の新しいホイルシールの一部を（サイズに合わせてカットし）穴を開けたウェルに貼り付けてください。ホイルシールが正しい位置で穴を開けたすべてのウェルを完全に覆っていることを確認してください。ローラーなどの適切なツールを使用して、ホイルを均一に貼り付けてください。
-  この使用説明書の断片化パラメータは出発点として提供されており、特定のサンプルの種類に応じて最適化が必要になる場合があります。
-  KAPA HyperPure Beadsは、ワークフロー開始の少なくとも30分前に保管場所から取り出し、室温に完全に馴染ませてください。使用していないときはビーズを遮光して保管してください。

ステップ1. 断片化とAテーリング

1. 0.1 ng ~ 500 ngのDNAを10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)(推奨)で希釈し、0.2 mLチューブまたはPCRプレートのウェルで総量35 μ Lにします。
2. FragTail ReadyMix をよくボルテックスし、軽く遠心分離します。
3. 以下の表に従って、氷上で各フラグメンテーション反応と A テーリング反応液を調製します。

コンポーネント	個々のサンプルあたりの量
0.1 ng ~ 500 ngのDNA	35 μ L
FragTail ReadyMix	25 μ L
総量	60 μ L

4. 断片化反応液とA-テーリング反応液をよく混合し、軽く遠心分離します。プレート/チューブを氷上に戻し、すぐに次のステップに進みます。
 -  フラグメンテーションと A テーリング反応が適切に混合されていない場合、フラグメントのサイズが大きくなる可能性があります。
5. サーマルサイクラーで4°Cに予冷し、下記のようにプログラムした状態でインキュベートします。可能な場合はリッドの温度を65°Cに加温してください。
 - a. 予冷ブロック：4°C
 - b. 断片化：37°C - 下の表を参照
 - c. Aテーリング：55°Cで30分
 - d. 冷却：4°C


推定インサートサイズ*	37°Cでのインキュベーション時間
180 bp	25 ~ 30分
200 bp	20 ~ 25分
250 bp	15 ~ 20分
300 bp	10 ~ 15分
450 bp	5 ~ 7分
500 bp	3 ~ 5分

* 100 ngの高品質ヒトDNA (NA 12878, Coriell Institute of Biomedical Research)を断片化して得られたインサートサイズ (アダプターなし)。DNAの種類、DNA量、DNA溶出バッファーによって、サイズにばらつきが生じる場合があります。断片化時間は、事前に最適化することをお勧めします。


-  ここで停止せずに、そのままステップ2「アダプターライゲーション」に直接進んでください。

ステップ 2. アダプターライゲーション

 KAPA UDI Adapterおよび KAPA Universal Adapterは、特に指定がない限り、以降は KAPA Adapterと呼ばれます。

 KAPA Ligation ReadyMixは高濃度のPEG 6000を含有しており、非常に粘性が高いです。使用前にバッファーをよくボルテックスしてください。

 KAPA Ligation ReadyMix を追加する前に、KAPA Adapterを各チューブ/ウェルに個別に追加する必要があります。

 KAPA Universal Adapterを使用する場合、サンプルインデックスはライブラリ増幅手順中に組み込まれます。サンプルのクロスコンタミネーションを避けるために注意が必要です。

1. 反応液をサーマルサイクラーから氷上に移します。
2. Ligation ReadyMix をよくボルテックスし、軽く遠心分離します。
3. 断片化とA-ターリングを行った同じプレート/チューブで、各アダプターライゲーションを組み立てます。氷上で以下の表の通り調製してください。

コンポーネント	液量
FragTail product	60 µL
KAPA Adapter (第2章)	5 µL
KAPA Ligation ReadyMix	10 µL
総量	75 µL


4. アダプターライゲーション反応液をよく混ぜ、遠心分離します。
5. アダプターライゲーション反応をサーマルサイクラーで20°C で 15 分間インキュベートします。
6. インキュベーション後、すぐに次のステップに進みます。

ステップ 3. KAPA HyperPure Beadsによるサンプルライブラリの精製

1. あらかじめ室温に戻しておいたKAPA HyperPure Beadsをよく懸濁し、各アダプターライゲーション反応液に、適切な量を加えます。

コンポーネント	KAPA UDI Adapter使用時の 個々のサンプルあたりの容量	KAPA Universal Adapter使用時の 個々のサンプルあたりの容量
ライゲーション反応生成物	75 µL	75 µL
KAPA HyperPure Beads	45 µL (0.6倍)	60 µL (0.8倍)
総量	120 µL	135 µL

2. 添加後、よく混ぜ、軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。ビーズがペレット化しないように注意してください。

 溶液を完全に混合、均一にすることが重要です。

 混合が不十分だと、サイズセレクションに影響がでたり回収率が低下する可能性があります。

3. サンプルを室温で 5 分間インキュベートし、サンプル ライブラリがビーズに結合できるようにします。
4. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
5. 上清を慎重に取り除いて捨てます。
6. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 µL を加えます。
7. サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。
8. エタノールを慎重に取り除いて捨てます。
9. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 µL を加えます。
10. サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。

11. エタノールを慎重に取り除き、捨てます。ビーズを動かさないように、残ったエタノールを除去します。

12. ビーズを室温で乾燥させ、エタノールが完全に蒸発するまで待ちます。



ビーズを過度に乾燥させると、収量が大幅に減少する可能性があります。ビーズペレットの表面が乾燥し、ひび割れたように見える場合は、過乾燥の兆候です。十分に乾燥すると、ビーズペレットはマットな外観になります。

13. サンプルをマグネットスタンドから取り外します。

14. ビーズを完全に再懸濁します。

14.1. ライブラリ増幅 (第4章)に進む場合は、25 μ Lの10mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)に懸濁します。

14.2. ダブルサイドサイズセレクション (付録A)に進む場合は、55 μ Lの10mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)に懸濁します。

15. サンプルを室温で2分間インキュベートし、サンプル ライブラリをビーズから溶出させます。

16. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを集めます。液体が透明になるまでインキュベートします。

17. 適切な量の透明な上清/溶出液を新しいチューブ/ウェルに移します。

17.1. ライブラリ増幅 (第4章)に進むには、上清20 μ Lを移すか、

17.2. ダブルサイドサイズセレクション (付録A)に進むには、上清50 μ Lを移します。



残りの5 μ Lは、KAPA Library Quantification Kitを使用した定量などの品質管理目的に使用できます。


18. 第4章「サンプル ライブラリの増幅」または第5章「品質管理」に進みます。DNAインプット量が50 ng 以上の場合には「サンプル ライブラリの増幅」はオプションですが、KAPA Universal Adapterを使用する場合は必須です。PCR フリーのワークフローの場合には「サンプル ライブラリの増幅」でなく「品質管理」に進みます (KAPA Universal Adapterを使用する場合はPCR フリーワークフローを適用できません)。




精製されたアダプター付きライブラリは、増幅および/またはシーケンシングの前に、2°C~8°Cで1~2週間、または-15°C~-25°Cで1ヶ月以内保存できます。劣化を防ぐため、サンプルライブラリは可能な限り緩衝液10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)で保存し、凍結融解の回数を最小限に抑えてください。

第4章 サンプルライブラリの増幅

この章では、必要に応じて、KAPA HiFi HotStart ReadyMix と適切な互換性のあるインデックスまたはプライマー セットを使用して、アダプター付きライブラリを増幅する方法について説明します。


 KAPA UDI Adapterをアダプターライゲーションに使用し、ライブラリ増幅を行う場合は KAPA Library Amplification Primer Mixを使用してください。


 KAPA Universal Adapterをアダプターライゲーションに使用した場合、増幅は必須です。各サンプルライブラリに、必ず固有の KAPA UDI Primer Mixesを追加してください。


以下が利用可能であることを確認してください。


- 新しく調製した80%エタノール
- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)
- ヌクレアーゼフリー、PCRグレード水


ステップ1. ライブラリ増幅反応の準備


 KAPA HyperPure Beadsは、ワークフロー開始の少なくとも30分前から室温に戻してください。使用しないときはビーズを遮光して保管してください。


 KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) にはアイススタビライザーが含まれているため、-15°C~-25°Cで保管しても完全に凍結しない場合があります。その場合でも、使用前に必ずReadyMixが完全に解凍され、十分に混合されていることを確認してください。

 KAPA HiFi HotStart ReadyMixのプレートフォーマットを使用する場合は、プレートを包装スリーブから取り出し、室温で（1時間未満）または適切な冷却試薬ブロック内で（1時間以上）解凍してください。完全に解凍したら、プレートをよくボルテックスし、室温で遠心分離（例えば、280 x gで30秒間）して、シールを破ったり剥がしたりする前に、すべての液体がウェルの底に回収されていることを確認してください。使用するまで氷上に保管してください。

 該当する場合は、第2章のステップ2cで調製したKAPA UDI Primer Mixesプレートを取り出し、解凍してください。プレートを280 x gで30秒間遠心分離し、内容物をウェルの底に集めます。必要なウェル数分のホイルシールを剥がすか、穴を開けてください。元のプレートからKAPA UDI Primer Mixesの一部のみを使用する場合は、ウェルに残ったプライマーを除去して廃棄し、キットに付属の新しいホイルシールを貼ってください。

 ホイルシールを突き刺す場合は、クロスコンタミネーションしないようウェルごとに新しいピペットチップを使用してください。

 未使用のプライマー ミックスを後日再利用するには、KAPA UDI Primer Mixes プレートを適切に再密封して保管する必要があります。

 KAPA HiFi HotStart ReadyMix を取り扱う際は、できるだけ氷の上に置いてください。

1. 以下の表に従って各ライブラリ増幅反応を混合します。

コンポーネント	液量
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	25 µL
KAPA Library Amplification Primer Mix*またはKAPA UDI Primer Mixes**	5 µL
アダプター付きライブラリ	20 µL
総量	50 µL

* KAPA UDI Adapterをアダプターライゲーションに使用した場合、ライブラリ増幅にはKAPA Library Amplification Primer Mixを使用してください。KAPA HiFi HotStart ReadyMixとKAPA Library Amplification Primer Mixは、できれば事前に混合し、1回のピペッティングで添加してください。

**KAPA Universal Adapterをアダプターライゲーションに使用した場合、各サンプルライブラリに一意的KAPA UDI Primer Mixesが追加されていることを確認してください。

2. よく混ぜ、軽く遠心分離します。すぐに次のステップに進みます。

ステップ2. ライブラリ増幅を実行

1. サンプルをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムでアダプター付きサンプルライブラリを増幅します。

ステップ	温度	間隔	サイクル数
初期変性	98℃	45秒	1
変性	98℃	15秒	表3を参照
アニーリング	60℃	30秒	
伸長	72℃	30秒	
最終伸長	72℃	1分	1
保管	4℃	∞	1

リッド温度：105℃

表3. インプットDNA量あたりの推奨増幅サイクル数

インプットDNA量	KAPA UDI Adapterを使用した場合*に WGS開始最低ラインである4 nM**を 確保するためのサイクル数	KAPA Universal Adapterを使用した場合*に WGS開始最低ラインである4 nM**を 確保するためのサイクル数
50 ng ~ 500 ng	0 (PCRフリー)	3 ~ 4
10 ng	3 - 5	4 - 5
1 ng	7 ~ 9	8 ~ 9
0.1 ng	11 ~ 13	12 ~ 13


* 必要なサイクル数は、アダプターと増幅プライマーの設計、サンプルの種類、品質、およびダブルサイズセレクションの有無によって異なります。KAPA Universal AdapterおよびKAPA UDI Primer MixesなどのTruncatedアダプターを使用する場合、ライゲーション後に十分な量のライブラリーが得られていても、次の工程（ターゲットキャプチャまたはシーケンシング）に進むためにはアダプター配列を付加する必要があります。増幅が必要です。最小限のサイクル数は3ですが、必要なサイクル数は、使用するアダプター、下流アプリケーション、増幅プライマーの設計によって異なります。FFPET由来DNAなど、特定のサンプルタイプでは、4nMの濃度に達するために追加の増幅サイクルが必要になる場合があります。また、FFPET由来DNAの品質によっても異なります。


**シーケンシングの推奨事項に基づき、シーケンシングを開始するための最小濃度は4 nMです。インプット量が50 ng以上の場合、シーケンシングに必要な約4 nMの濃度を達成するためにPCR増幅は必要ありません（KAPA Universal Adapterを使用してライブラリを構築した場合を除く）。4 nMを超える濃度が必要な場合は、目標濃度に達するまで増幅サイクル数を2サイクルずつ調整できます。この調整には最適化が必要になる場合があります。注：サイクル数を増やすと、複製率が上昇し、最終的にはライブラリの複雑さが減少します。

2. すぐに次のステップに進みます。

ステップ3. KAPA HyperPure Beadsによる増幅サンプルライブラリの精製

 KAPA UDI Adapterを使用して1 ng以上のインプットDNAからライブラリを調製した場合は、ステップ3aに進みます。


 KAPA UDI Adapterを使用して0.1 ng以上、1 ng未満のインプットDNAからライブラリを調製した場合は、ステップ3bに進みます。


 KAPA Universal AdapterとKAPA UDI Primer Mixesを使用して0.1 ng - 500 ngのインプットDNAからライブラリを調製した場合は、ステップ3bに進みます。


ステップ3a. 1 ng以上のDNAからKAPA UDI AdapterとKAPA Library Amplification Primer Mixを用いて調製した増幅サンプルライブラリの精製

- 増幅したサンプルライブラリごとに、室温で十分に再懸濁した KAPA HyperPure Beads 50 µL (1X) を加えます。
- 増幅したサンプルライブラリとKAPA HyperPure Beadsをよく混合し、軽く遠心分離してすべての液滴を回収します。ビーズをペレット化させないように注意してください。
- 増幅されたサンプルライブラリがビーズに結合できるように、サンプルを室温で5分間インキュベートします。
- サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
- 上清を慎重に取り除いて捨てます。
- サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した80%エタノール200 µLを加えます。
- サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。


8. エタノールを慎重に取り除いて捨てます。
9. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μ L を加えます。
10. サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。
11. エタノールを慎重に取り除き、捨てます。ビーズを動かさないように、残ったエタノールを除去します。
12. ビーズを室温で乾燥させ、エタノールがすべて蒸発するまで十分に乾燥させます。

 ビーズを過度に乾燥させると、収量が大幅に減少する可能性があります。ビーズペレットの表面が乾燥し、ひび割れたように見える場合は、過乾燥の兆候です。十分に乾燥すると、ビーズペレットはマットな外観になります。
13. サンプルをマグネットスタンドから取り外します。
14. ビーズを25 μ L (または適切な量)の10 mM Tris-HCl (pH 8.0 ~ 8.5)によく再懸濁します。軽く遠心分離して、すべての液滴を収集します。


 ビーズがペレット化しないようにします。



 ダブルサイドサイズセレクションを進める場合は、ビーズを 55 μ L の10mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5)に再懸濁します。
15. サンプルを室温で 2 分間インキュベートし、増幅されたサンプル ライブラリをビーズから溶出させます。
16. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
17. 適切な量の透明な上清/溶出液を新しいチューブ/ウェルに移し、ダブルサイドサイズセレクション (付録Aを参照)、ライブラリ QC、ターゲットキャプチャまたはシーケンスに進みます。
18. 精製・増幅されたサンプルライブラリは、2°C ~ 8°C で 1 ~ 2 週間、または -15°C ~ -25°C で最大 3 か月間保存できます

ステップ3b. 0.1 ng以上1 ng未満のDNAからKAPA UDI Adapterを用いて調製した増幅サンプルライブラリ、または0.1 ng ~ 500 ngのDNAからKAPA Universal AdapterとKAPA UDI Primer Mixesを用いて調製したライブラリの精製

 KAPA Universal AdapterとKAPA UDI Primer MixesをKAPAライブラリ調製キットと併用する場合は、増幅後の2回目のクリーンアップを強くお勧めします。KAPA UDI Adapterを用いて調製するライブラリでも、DNAインプット量が0.1 ng以上1 ng未満の場合には、増幅後の2回目のクリーンアップを推奨します。特に、WGSライブラリをIllumina NovaSeqまたはHiSeq Xシステム (パターン化フローセル搭載)でシーケンスする場合は、この追加のクリーンアップが効果的です。この追加のクリーンアップにより、インデックスホッピングを悪化させる可能性のあるインデックスプライマーのキャリアオーバーが除去されます。

1. 増幅したサンプルライブラリに、室温で十分に再懸濁したKAPA HyperPure Beads 50 μ L (1倍)を加える。
2. 増幅したサンプルライブラリと KAPA HyperPure Beads をよく混合し、軽く遠心分離してすべての液滴を収集します。
3. 増幅されたサンプルライブラリがビーズに結合できるように、サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
4. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
5. 上清を慎重に取り除いて捨てます。
6. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μ L を加えます。
7. サンプルを30秒以上インキュベートします。
8. エタノールを慎重に取り除いて捨てます。
9. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μ L を加えます。
10. サンプルを30秒以上インキュベートします。
11. エタノールを慎重に取り除き、捨てます。ビーズを動かさないように、残ったエタノールを除去します。
12. ビーズを室温で乾燥させ、エタノールがすべて蒸発するまで十分に乾燥させます。

 ビーズを過度に乾燥させると、収量が大幅に減少する可能性があります。ビーズペレットの表面が乾燥し、ひび割れたように見える場合は、過乾燥の兆候です。十分に乾燥すると、ビーズペレットはマットな外観になります。
13. サンプルをマグネットスタンドから取り外します。
14. ビーズを10 mM Tris-HCl(pH 8.0 ~ 8.5) 50 μ Lによく再懸濁します。軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。ビーズがペレット化しないようにします。

15. サンプルを室温で 2 分間インキュベートし、増幅されたサンプル ライブラリをビーズから溶出させます。
16. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
17. 透明な上清 50 μL を新しいチューブに移します。このステップで持ち越されたビーズは、次のステップで除去します。
18. 各サンプルに、室温で完全に再懸濁した KAPA HyperPure Beads 50 μL を加えます。
19. ピペティングまたはボルテックスでよく混ぜ、軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。
20. 増幅されたサンプルライブラリがビーズに結合できるように、サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
21. サンプルをマグネットスタンドの上に置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
22. 上清を慎重に取り除き、捨てます。
23. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μL を加えます。
24. サンプルを 30 秒以上インキュベートします。
25. エタノールを慎重に取り除いて捨てます。
26. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μL を加えます。
27. サンプルを 30 秒以上インキュベートします。
28. エタノールを慎重に取り除き、捨てます。ビーズを動かさないように、残ったエタノールを除去します。
29. エタノールがすべて蒸発するまでビーズを室温で乾燥させます。
 ビーズを過度に乾燥させると、収量が大幅に減少する可能性があります。ビーズペレットの表面が乾燥し、ひび割れたように見える場合は、過乾燥の兆候です。十分に乾燥すると、ビーズペレットはマットな外観になります。
30. サンプルをマグネットスタンドから取り外します。
31. ビーズを 25 μL (または適切な量) の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 ~ 8.5) によく再懸濁します。軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。ビーズがペレット化しないように注意してください。
 ダブルサイドサイズセレクション (付録A) を進める場合は、ビーズを 55 μL の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5) に再懸濁します。
32. サンプルを室温で 2 分間インキュベートし、増幅されたサンプル ライブラリをビーズから溶出させます。
33. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
34. 適切な量の透明な上清を新しいチューブ/ウェルに移し、ダブルサイドサイズセレクション (付録Aを参照)、ライブラリQC、ターゲットキャプチャ、またはシーケンスに進みます。
35. 精製・増幅されたサンプルライブラリは、2°C ~ 8°C で 1 ~ 2 週間、または -15°C ~ -25°C で最大 3 か月保存できます。

この章では、サンプルライブラリの濃度とサイズ分布を決定する方法について説明します。ライブラリ構築ワークフローは、プロセスの次のステップ（ターゲットキャプチャやシーケンシングなど）に必要な量の、目的のサイズ分布を有するアダプター付きライブラリが得られるように、またライブラリの品質管理やアーカイブ化のために、カスタマイズおよび最適化する必要があります。

定量

KAPA EvoPlus V2ワークフローで生成されたライブラリのqPCRベースの定量には、KAPA Library Quantification Kitが推奨されます。ライブラリは、Qubit FluorometerとQubit dsDNA HS Assay Kitを用いて定量することも可能です。

サイズ確認

最終ライブラリのサイズ分布は電気泳動法で確認する必要があります。一般的なゲルではなく、LabChip GX、GXII、またはGX Touch（PerkinElmer社）、Bioanalyzer、TapeStation（Agilent Technologies社）、Fragment Analyzer（Advanced Analytical社）システム、または類似の機器の使用をお勧めします。KAPA EvoPlus V2 Kitのライブラリは、電気泳動による評価の前に希釈が必要な場合があります。

特定のアッセイの検出限界を超えないようにサンプルライブラリを希釈する方法については、それぞれの機器およびアッセイのユーザーマニュアルを参照してください。

KAPA EvoPlus V2 Kitで作成されたライブラリの典型的な電気泳動プロファイルを図3に示します。

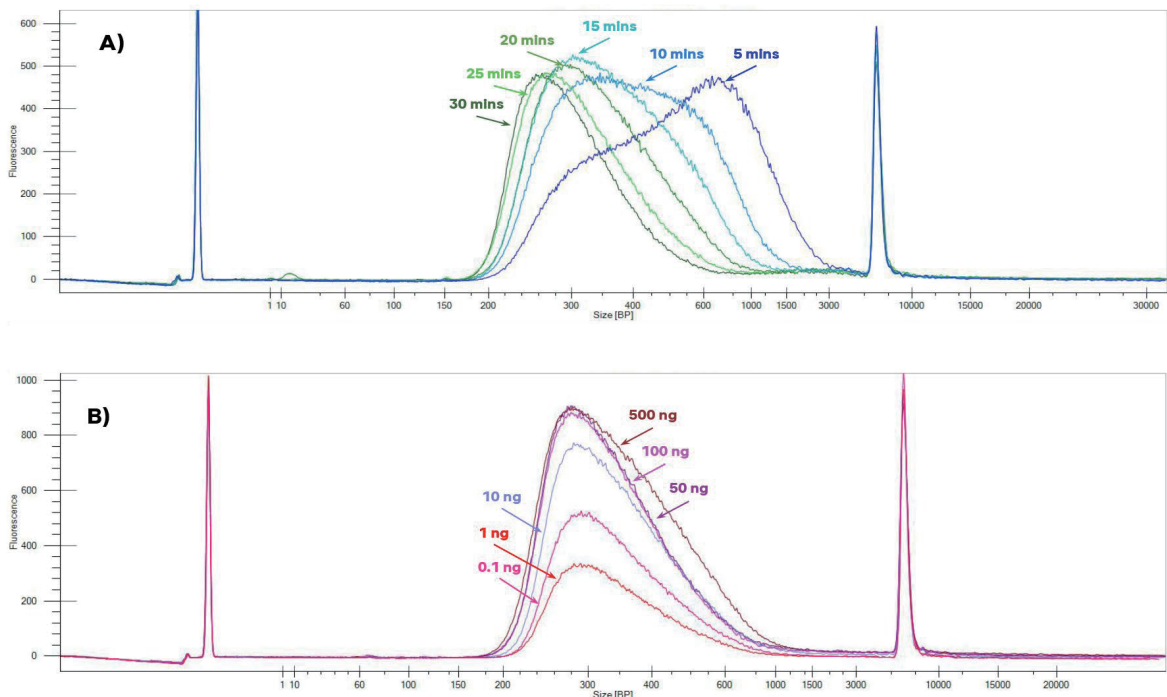


Figure 3: Examples of libraries prepared with the KAPA EvoPlus V2 Kit.

A) 100 ng of high-quality human genomic DNA was fragmented for 5 - 30 minutes and used to prepare libraries with KAPA UDI Adapters at the recommended adapter:insert molar ratio. Libraries were amplified for 3 cycles to enable visualization. Electropherograms were generated with LabChip GX Touch NGS 3K Assay.

B) Various high-quality human genomic DNA inputs (0.1 - 500 ng) were fragmented to ~200 bp and used to prepare libraries with KAPA Universal Adapters at the recommended adapter:insert molar ratios. Libraries were amplified according to DNA input based recommendations and diluted appropriately to fall within the dynamic range of the assay. Electropherograms were generated with LabChip GX Touch NGS 3K Assay.



PCRフリーのワークフローで「フォーク型」または「Y型」アダプターを用いて調製したライブラリは、電気泳動分析において、予想よりも長いモードフラグメント長を示し、ブロードまたは二峰性のサイズ分布を示す場合があることにご注意ください。増幅前のライブラリと対応する増幅後のライブラリの全体的な外観とフラグメントサイズ分布の違いは異なり、アダプターの設計と使用する電気泳動システムによって異なります。増幅前のライブラリのサイズ分布を正確に決定するために、電気泳動分析の前にライブラリの一部を数回増幅サイクルにかけ、アダプターが付いたすべての分子が完全に二本鎖になっていることを確認する必要があります（例：アダプター付きライブラリ 1 μ L を 4 サイクル増幅した後、ビーズでクリーンアップします）。

付録A.ダブルサイドサイズセレクション

ダブルサイドサイズセレクションの要件は、シーケンシングアプリケーションによって大きく異なります。例えば、Illumina HiSeq XやNovaSeqといった機器を用いたシーケンシングでは、インサートサイズの分布が狭いこと（300～650 bpの範囲）と、未ライゲーションアダプターやアダプターダイマーなどの短い断片を含まない、シーケンシングに適したライブラリが求められます。これは、最適なクラスター生成を確保し、インデックスの誤割り当てによる潜在的な影響を軽減し、データ解析を容易にするために不可欠です。必要に応じて、一般的に使用されるビーズまたはゲルベースのサイズ選択手法を KAPA EvoPlus V2 ワークフローに統合できます。サイズセレクションは、ライゲーション後のクリーンアップ後やライブラリ増幅後のクリーンアップ後など、ワークフロー全体のさまざまなポイントで実行できます。

サイズセレクションは必然的にサンプルの損失につながります。この損失は劇的（60～95%）になる可能性があり、プロセスの次のステップ（キャプチャまたはシーケンシング）に必要な十分な材料を生成するために必要な増幅サイクル数が大幅に増加する可能性があります。

ライブラリ構築ワークフローにおいて、1段階または複数段階のサイズ選択ステップを導入することの潜在的な利点は、ライブラリの複雑性の低下の可能性と比較して検討する必要があります。特に、インプットDNA量が限られている場合はなおさらです。適切に最適化された断片化プロトコルは、特に短いインサートライブラリやリード長の場合、サイズセレクションの必要性を排除し、ライブラリ構築プロセスを簡素化し、サンプル損失を最小限に抑えることができます。

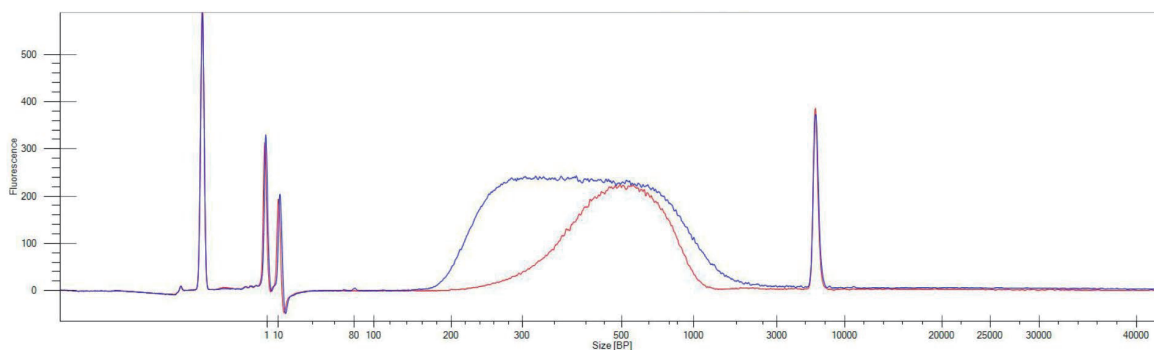


Figure 4: Example of libraries prepared with the KAPA EvoPlus V2 Kit subjected to double-sided size selection.

Size selection inevitably leads to a loss of sample material, and can be dramatic (60 - 95%). Blue trace: library before double-sided size selection. Red trace: library after double-sided size selection. Input DNA (500 ng high quality *E. coli* gDNA) was fragmented for 12 minutes. Libraries were prepared using KAPA UDI Adapters and subjected to 0.5X - 0.7X double-sided size selection post-ligation using KAPA HyperPure Beads (libraries were amplified for visualization). Electropherograms were generated with LabChip GX Touch NGS 3K Assay.

ダブルサイドサイズセレクションは、ビーズとサンプルの体積比を変えて行われる1回目のカットと2回目のカットから構成されます。1回目のカットはサイズ選択サンプルライブラリの上限サイズを決定し、2回目のカットは下限サイズを決定します。選択した断片のサイズ上限を大きくするには、最初のカットで使用するKAPA HyperPureBeadsの量を減らしてください。選択した断片のサイズ上限を小さくするには、最初のカットで使用するKAPA HyperPureBeadsの量を増やしてください。選択した断片のサイズの下限值を大きくするには、2回目のカットで追加するKAPA HyperPureBeadsの量を減らします。選択した断片のサイズの下限值を小さくするには、2回目のカットで追加するKAPA HyperPureBeadsの量を増やします。



2回目のカットに必要な KAPA HyperPure Beads の量は、最初のカット後に移された上清を含むサンプルの量ではなく、サイズセレクション手順の開始時のサンプル ライブラリの量に対して計算されます。

2回目のサイズカットは、KAPA HyperPure Beads の元の入力量の少なくとも 0.2 倍量で実行する必要があります。

1回目のカットと2回目のカットの差が約0.2倍未満の場合、サンプル回収率は大幅に低下します。回収量を増やすには、2回目のカットに0.2倍を超える KAPA HyperPure Beadsを使用できますが、その場合、回収されるライブラリフラグメントのサイズが小さくなったり、サイズ分布が広がったりする可能性がありますのでご注意ください。

この付録 (0.5X ~ 0.7X) で概説するダブルサイズセレクションプロトコルは、FragTail ReadyMixを用いて高品質DNAを約15分間断片化することで、300 ~ 600 bp の範囲のライブラリ分子 (KAPA UDI AdapterなどのFull-lengthタイプアダプターを含む) を選択するために設計されています。ライブラリ構築にTruncatedタイプのアダプターを使用した場合は、プロトコルの変更が必要になる場合があります。

より短い分子またはより長いDNAを取得するには、プロトコルを以下のように変更することができます。

回収するDNAサイズの上限	修正	回収するDNAサイズの下限	修正
上げたい場合	1回目のビーズ使用量を減らす (例: 0.4倍または0.45倍)	上げたい場合	2回目のビーズ使用量を減らす (例: 0.6倍または0.65倍)
下げたい場合	1回目のビーズ使用量を増やす (例: 0.6倍または0.65倍)	下げたい場合	2回目のビーズ使用量を増やす (例: 0.8倍または0.85倍)

1. 以下を混合して、最初のサイズセレクション (0.5Xカット)を行います。
(これは約600 bpを超えるライブラリ分子をビーズに結合させて除去する工程です)

コンポーネント	液量
サイズセレクションするライブラリ	50 μ L
KAPA HyperPure Beads	25 μ L
総量	75 μ L

2. サンプルライブラリとKAPA HyperPure Beadsをよく混ぜ、軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。
ビーズがペレット化しないように注意してください。
3. サンプルを室温で5分間インキュベートし、ビーズに約600 bpより大きいライブラリ分子が結合できるようにします。
4. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
5. 約600 bp 未満のライブラリ分子を含む上清約 70 μ L を新しいチューブ/ウェルに慎重に移します。
ビーズが上清と一緒に移行しないように注意してください。約600 bpを超えるライブラリ分子が結合したビーズが入ったチューブ/ウェルは廃棄してください。
6. 次のものを組み合わせて、ライブラリ分子 > 300 bp を保持するために 2 回目のサイズカット (0.7X) を実行します。

コンポーネント	液量
1回目のサイズセレクションで得られた上清	70 μ L
KAPA HyperPure Beads	10 μ L*
総量	80 μ L

* 2 回目のカットに必要な KAPA HyperPure Beads の量は、サイズセレクション開始時のサンプルライブラリの量に対して計算されます。1 回目のカット後に移された上清を含むサンプルの量ではありません。10 μ L の KAPA HyperPure Beads が 2 回目のカット中に追加されます。これはエラーではありません。手順 5 の上清には、最初の 0.5倍量の KAPA HyperPure Beads の PEG/NaCl が含まれており、1 回目のカットから 2 回目のカットに持ち越されます。この量の PEG/NaCl (混雑試薬) が重要な機能成分です。したがって、2 回目のカットに必要な 0.7X 比率は累積合計比率です。これは、1 回目のカットから保持された元の 0.5X 比率と、2 回目のカットで追加された 0.2X の合計で、合計比率は 0.7X (0.5X + 0.2X) になります。

7. 最初のサイズカットの上清とKAPA HyperPureBeadsをよく混ぜ、軽く遠心分離してすべての液滴をチューブの底に集めます。
このときビーズがペレット化しないように注意してください。
8. サンプルを室温で5分間インキュベートし、300 bpを超えるライブラリ分子をビーズに結合します。
9. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
10. 上清を慎重に取り除いて捨てます。
11. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μ L を加えます。
12. サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。
13. エタノールを慎重に取り除いて捨てます。



2 回目のカットで使用するビーズ量が少ないと、ビーズペレットが小さくなり、簡単に乱れ、他の反応のクリーンアップ時よりもかなり早く乾燥する可能性があります。

14. サンプルをマグネットスタンドに置いたまま、新しく調製した 80% エタノール 200 μ L を加えます。
15. サンプルを室温で30秒以上インキュベートします。
16. エタノールを慎重に取り除き、捨てます。ビーズを動かさないように、残ったエタノールを除去します。
17. ビーズを室温で乾燥させ、エタノールがすべて蒸発するまで十分に乾燥させます。



ビーズを過度に乾燥させると、収量が大幅に減少する可能性があります。ビーズペレットの表面が乾燥し、ひび割れたように見える場合は、過乾燥の兆候です。十分に乾燥すると、ビーズペレットはマットな外観になります。

18. サンプルをマグネットスタンドから取り外します。
19. ビーズを10 mM Tris-HCl (pH 8.0 ~ 8.5) 25 μ Lによく再懸濁します。軽く遠心分離してすべての液滴を集めます。ビーズがペレット化しないようにします。
20. サンプルを室温で 2 分間インキュベートし、サンプル ライブラリをビーズから溶出させます。
21. サンプルをマグネットスタンドに置き、ビーズを捕捉します。液体が透明になるまでインキュベートします。
22. 溶出液20 μ Lを新しいチューブ/ウェルに移します。
23. 精製されたライブラリは次のように保存できます。
 - 23.1. ライゲーション後のライブラリ：2°C ~ 8°Cで1 ~ 2週間、または-15°C ~ -25°Cで最大1か月間。
 - 23.2. 増幅後のライブラリ：2°C ~ 8°Cで1 ~ 2週間、または-15°C ~ -25°Cで最大3か月。

付録B. トラブルシューティング

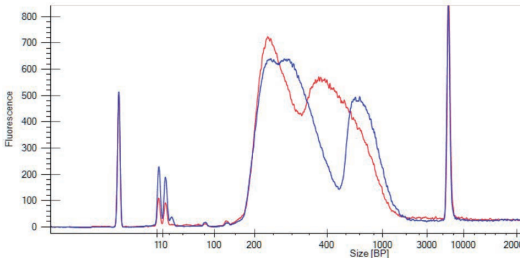
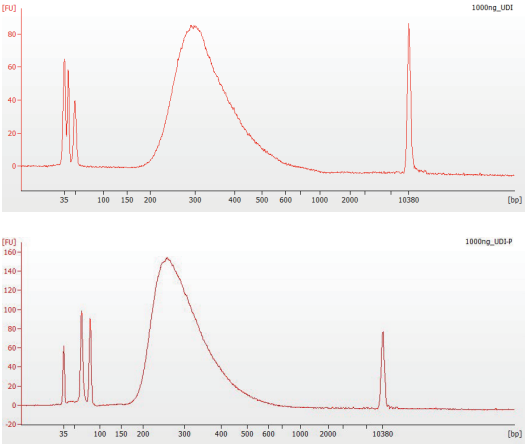
この付録では、予期せぬ結果の解釈に関するガイダンスと、問題が発生した場合の是正措置の実施に関する推奨事項を示します。



illumina シーケンスワークフローは、日本ジェネティクス及びロシュのテクニカルサポートではサポートされていません。

観察	原因 / 推奨事項
ライブラリの収率が低い	インプットDNAが正しく定量されませんでした。反応に加えるDNA量が少なすぎると、期待される収量に影響が出ます。
	低品質の DNA (通常、DIN が7 未満) では、ライブラリ作成する際インプット量を増やすなど、インタクトな DNA と比べて追加のワークフロー変更が必要になる場合があります。
	アダプターの品質が低下しています。凍結/解凍サイクル (F/T) が最小限に抑えられた高品質のアダプターを使用してください。 たとえば、KAPA UDI Adapterは最大 10 F/T サイクルまで安定しています。
	アダプター濃度が低すぎます。正しいアダプター濃度が使用されていることを確認してください。
	ビーズクリーンアップが不適切でした。ビーズクリーンアップの際は、適切な操作方法を守ってください。 <ul style="list-style-type: none"> • KAPA HyperPure Beadsを室温に戻してから使用してください。 • ビーズクリーンアップには、常に新鮮な80%エタノールを準備してください。80%エタノールを長期保存すると蒸発し、使用されるエタノール濃度が低下し、結果としてサンプルの損失につながります。 • KAPA HyperPure Beadsを凍結/解凍しないでください。-20°Cで保管するとビーズの性能が損なわれます。 • KAPA HyperPure Beadsを長期保管時は光から保護してください。 • ビーズを乾燥させすぎないでください。
	ダブルサイドサイズセレクションを実施しました。 ダブルサイドサイズセレクションはサンプルの大幅な損失につながるため、絶対に必要な場合にのみ実施してください。
	混合が不十分です。KAPA EvoPlus V2 Kitの成分は非常に粘性が高いため、混合が不十分だと酵素反応が効率的に行われず可能性があります。ピペットで少なくとも10回混合するか、10 ~ 20秒間ボルテックスにかけます。
	ライブラリが正しく保存されていない。ライブラリが正しく保存されていない場合、時間の経過とともに劣化する可能性があります。

観察	原因 / 推奨事項
<p>Agilent バイオアナライザー 2100高感度DNAアッセイによるフラグメント分布で、約150 bpに鋭いピークが認められる (アダプターダイマー)。</p> <p>通常、0.8倍または1倍のビーズ洗浄を再度行うことで、アダプターダイマーのコンタミネーションを除去できます。アダプターダイマーのコンタミネーションがライブラリ総濃度の5%を超える場合は、2回目の洗浄をお勧めします。アダプターダイマーの割合は、Bioanalyzerソフトウェアなどを用いたスメア解析によって計算できます。Illumina NovaSeqやHiSeq Xで使用されているようなパターン化フローセルでライブラリをシーケンスする場合は、アダプターダイマーを絶対に避けてください。</p> 	<p>インプットDNA が正しく定量化されず、結果として間違ったアダプター濃度が使用されました。</p> <p>分解されたDNAやFFPET由来のDNAは効率的なライゲーションを阻害し、アダプターダイマーの形成につながる可能性があります。分解されたDNAの場合はアダプター濃度を下げてください。収量とアダプターダイマーのキャリーオーバーのバランスが取れるまで、滴定を行ってください。</p> <p>アダプターの品質が低下しています。凍結融解サイクル (F/T)が最小限に抑えられた高品質のアダプターを使用してください。 例：KAPA UDI Adapterは、最大10回のF/Tサイクルまで安定しています。</p> <p>アダプターとインサートのモル比はアダプターダイマーの形成に影響を及ぼします。アダプター濃度が高すぎると、アダプターダイマーのキャリーオーバーが発生する可能性があります。</p> <p>ビーズの洗浄方法が不適切でした。ビーズクリーンアップの際は、適切な操作方法を守ってください。</p> <ul style="list-style-type: none"> • KAPA HyperPure Beadsは、使用前に室温に戻す必要があります。 • ビーズの洗浄には、常に新鮮な80%エタノールを準備してください。80%エタノールを長期保存すると蒸発し、使用されるエタノール濃度が低下し、結果としてサンプルが失われます。 • KAPA HyperPure Beadsを凍結/解凍しないでください。- 20°Cで保管するとビーズの性能が損なわれます。 • KAPA HyperPure Beadsを長期保管時は遮光してください。 • ビーズを乾燥させすぎないでください。 <p>ビーズとサンプルの比率が正しくありません。アダプターダイマーが除去されずに保持されてしまいます。</p> <p>混合が不十分です。KAPA EvoPlus V2 Kitの成分は非常に粘性が高いため、混合が不十分だと酵素反応が効率的に行われない可能性があります。ピペットで少なくとも10回混合するか、10～20秒間ボルテックスにかけます。</p>
<p>フラグメントの分布で、増幅されたフラグメントの平均が予想されるサイズ範囲内になく、高分子アーティファクトが見られる。</p>	<p>断片化が不十分でした。ライブラリ調製をやり直してください。目的の断片サイズに適したインキュベーション時間と温度が選択されていることを確認してください。</p> <p>混合が不十分です。KAPA EvoPlus V2 Kitの成分は非常に粘性が高いため、混合が不十分だと酵素反応が効率的に行われない可能性があります。PEG 6000の液滴は目視で確認できないはずで、少なくとも10回ピペットで混ぜるか、10～20秒間ボルテックスします。</p>

観察	原因 / 推奨事項
<p>LabChip GX TouchおよびLabChip NGS 3Kアッセイによるフラグメント分布で、予想されるフラグメントセットに加えてより大きなフラグメントセットの二峰性の形状が観察される。</p> 	<p>A. PCRフリーのライブラリを電気泳動分析にかけました。 PCRフリーのワークフローでは、長い一本鎖末端を持つアダプターに挟まれた分子がゲルマトリックス内で異常な移動を示し、実際よりも長く見えるため、電気泳動システムから正確な平均断片サイズを得ることが困難です。この問題に対する簡単な回避策としては、以下のものがあります。</p> <ul style="list-style-type: none"> 断片化されたDNAの平均の長さ合計の長さを使用して、濃度計算における平均ライブラリ断片サイズの推定値として、2つのアダプターの長さ（通常は約140 bp）を使用します。このアプローチは、サイズセレクションが実行されなかった場合、または断片化されたDNAのサイズ分布を維持するようにサイズセレクションパラメータが最適化された場合のみ実行可能です。 PCRフリーライブラリの少量を2～5サイクル増幅し（その後1倍ビーズクリーンアップ）、電気泳動分析に供します。増幅により全ての分子が完全に二本鎖となり、電気泳動アッセイから信頼性の高いサイズ決定が可能になります。 <p>B. プライマー枯渇 反応に利用可能なプライマー量に対してサンプルライブラリが過剰に増幅された結果、プライマーが枯渇し、一本鎖増幅産物が生成されます。これらの増幅産物は、断片の両端のアダプターホモロジーを介して互いにアニールし、ヘテロ二本鎖を形成します。フラグメントアナライザーでは、実際の塩基対長よりも大きな増幅産物として検出されます。このアーティファクトは、プライマー濃度を上げるか、PCR反応のサイクル数を減らすことで解消できますが、増幅産物自体はシーケンスキャプチャおよびシーケンシングに完全に使用できません。</p>
<p>Agilentバイオアナライザー高感度DNAチップによるフラグメント分布で、44 bpと45 bp、または約47 bpと49 bpに鋭いピークが認められる（プライマーキャリアオーバー）。</p>  <p>上の画像：KAPA UDI Adapter を使用して構築され、KAPA Library Amplification Primer Mixで増幅されたライブラリのプライマーキャリアオーバー</p> <p>下の画像：KAPA Universal Adapter を使用して構築され、KAPA UDI Primer Mixesを使用して増幅されたライブラリのインデックスプライマーキャリアオーバー</p>	<p>プライマーのキャリアオーバーは、通常、増幅されたライブラリで見られ、増幅後のクリーンアップでは完全に除去されません。</p> <p>KAPA Library Amplification Primer Mix (Full-lengthタイプのKAPA UDI Adapterを使用して構築されたライブラリを増幅するために使用される)の持ち越しは、シーケンスに干渉しないため、無視しても問題ありません。</p> <p>一方で、KAPA UDI Primer Mixes とKAPA Universal Adapterを組み合わせる場合、キャリアオーバー インデックス プライマーによって、パターン化されたフローセル (Illumina NovaSeq または HiSeq X 機器など)でのインデックス ホッピングが悪化する可能性があります。</p> <p>通常、増幅後にもう一度1X ビーズ クリーンアップを行うとプライマーのキャリアオーバーが除去されるため、KAPA UDI Primer Mixes を使用する場合は強くお勧めします。</p>

KAPA はロシュの商標です。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「INSTRUCTIONS FOR USE OF KAPA EvoPlus V2 Kit, April 2024, Version 4.1」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 〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階
<https://n-genetics.com> ✉ info@genetics-n.co.jp ☎ 03 (3813) 0961 📠 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2026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。

M0209