



Technical Data

KAPA HyperPlus Kitの断片化性能評価試験

評価製品

ライブラリー調製キット KAPA HyperPlus Kit

目的

KAPA HyperPlus Kitの取扱説明書の推奨通りに断片化を実施し、それぞれのサイズを確認した。

テストに用いた当社取扱い製品



KAPA社 ライブラリー調製キット
KAPA HyperPlus Kit
KK8510 8回用
KK8512 24回用
KK8514 96回用

キット内容

KAPA Frag Enzyme	Ligation Buffer
KAPA Frag Buffer (10X)	DNA Ligase
KAPA Frag Conditioning Solution	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)
End Repair & A-Tailing Buffer	Library Amplification Primer Mix (10X)
End Repair & A-Tailing Enzyme	

KAPA HyperPlus Kit のWorkflow

※事前にオリジナルの英文マニュアルを必ずご確認ください。

dsDNA sample
(35 μL)

- Conditioning solutionの準備 (サンプル中のEDTAの濃度に合わせて調製する)
例) サンプルがTE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 5 μLに溶解しているとき
final EDTA conc. = 0.1mM
EDTA 0.1mM Conditioning solution :
Conditioning solution (per 100 μL) 6.5 μL
PCR-grade water (per 100 μL) 93.5 μL

ポイント

EDTAは酵素反応を阻害します
サンプルがEDTA入りの溶液の場合はConditioning solutionをご使用ください

- 1で準備したDNAを2で準備したConditioning solutionで調製する

Component	Volume
DNA	5 μL
PCR-grade water	25 μL
Conditioning solution	5 μL
total	35 μL

Conditioning solution の組成

Final EDTA concentration in 50 μL rxn	Dilution Factor	Volume of Conditioning Solution (per 100 μL)	Volume of PCR-grade water (per 100 μL)
0.02-0.05 mM	32	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

- KAPA Frag酵素をon iceで調製する

Component	Volume
KAPA Frag Enzyme	10 μL
KAPA Frag Buffer (x10)	5 μL
total	15 μL

ポイント

EDTAを含まない溶液をご使用の際には、Conditioning solutionを使用せず、そのぶんをPCR-grade waterで調製してください。

- 3と4を混合し、Vortex, Spin down

ポイント

酵素の量は、DNAの量によらず、すべて同じです

- 断片化のためにサーマルサイクラーでインキュベートする

Step	Temp	Time
Pre-cool block	4 °C	N/A
Fragmentation	37 °C	
HOLD	4 °C	∞

ポイント

サーマルサイクラーのHeat LidはOFFに設定します

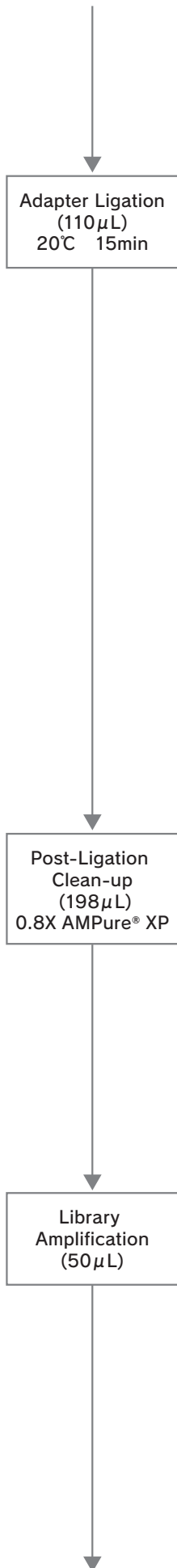
Mode fragment length	Incubation time at 37°C
600bp	5 min
350bp	10 min
200bp	20 min
150bp	30 min

Fragmentation
(50 μL)
37°C 5-40min
↓
4°C

- 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
Fragmented, double-stranded DNA	50 μL
End Repair & A-Tailing Buffer*	7 μL
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix*	3 μL
Total volume	60 μL

End Repair and
A-Tailing(60 μL)
65°C 30min



7. Vortex , Spin down

8. 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 °C	30 min
HOLD	4 °C	∞

ポイント

サーマルサイクラーのHeat Lidは85°Cに設定します

9. End Repair と A-Tailing反応を行ったサンプルを、Adapter-Ligation反応を行うために、溶液調製する

Component	Volume
End Repair and A-Tailing reaction product	60 μL
Adapter stock (concentration as required)	5 μL
PCR-grade water	5 μL
Ligation Buffer	30 μL
DNA Ligase	10 μL
Total volume	110 μL

推奨Adapter濃度

インプット DNA量	アダプター ストック濃度	アダプター： インサートのモル比	インプット DNA量	アダプター ストック濃度	アダプター： インサートのモル比
1 μg	15 μM	10:1	25 ng	7.5 μM	200:1
500 ng	15 μM	20:1	10 ng	3 μM	200:1
250 ng	15 μM	40:1	5 ng	1.5 μM	200:1
100 ng	15 μM	100:1	2.5 ng	750 μM	200:1
50 ng	15 μM	200:1	1 ng	300 μM	200:1

*アダプター：インサートのモル比は、200bpのDNA断片長に基づいており、DNA断片が長い場合は高く、サイズが200bp未満に断片化されるDNAの場合はやや低くなります。100ng超のインプット量に推奨されるアダプター：インサートの低いモル比は、ライブラリー構築効率と費用の適正な兼ね合いを示しており、高いアダプター濃度を用いると高いライブラリー収量が得られます。

10. 20°C 15minインキュベーションする

注意：Low-input サンプルでのより高い conversion rate とライブラリー収量のために、ライゲーション時間を検討してください。ライゲーション時間の最大は、20°Cで4時間、4°Cでオーバーナイトです。ただし、長時間のライゲーションは、アダプターダイマーを引き起こします。ライゲーション時間を延長する場合には、アダプターの濃度を最適化する必要があります。

11. Clean-upを行うための溶液を調製する

Component	Volume
Adapter Ligation reaction product	110 μL
Agencourt® AMPure® XP reagent	88 μL
Total volume	198 μL

12. Vortexし、ビーズとDNAを結合させるために、室温5-15minで静置

13. プレート/チューブをマグネットの上に置き、溶液がクリアになるまで静置して上清を注意深く取り除いてください

14. 80% EtOH , 200 μLを加えてビーズを洗浄する(2回)

15. ビーズを室温3-5minでDry up

ポイント

Dry upしすぎると、DNAの収量が落ちることがあります

16. 25 μLのElution buffer(10mM Tris-HCl pH8.0-8.5)をいれ、室温2min静置し、上清を回収する

17. Library Amplificationのための溶液を調製し、spin down

Component	Volume
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 μL
10X KAPA Library Amplification Primer Mix	5 μL
Adapter-ligated library	20 μL
Total volume	50 μL

サイズセレクションを行う場合

55 μL の Elution buffer(10mM Tris-HCl pH8.0-8.5) をいれてください。

サイズセレクションの方法に関しては、オリジナルの英文マニュアルをご確認ください。

(KAPA HyperPlus Kit Technical Data Sheet P15)

18. サーマルサイクラーを用いて増幅反応を行う

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98°C	45 sec	1
Denaturation	98°C	15 sec	Minimum number required for optimal amplification
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	1 min	1
HOLD	4°C	∞	1

Post-Amplification
Clean-up (50 μ L)
1X SPRI

19. Clean-upを行うための溶液を調製する

Component	Volume
Library Amplification reaction product	50 μ L
Agencourt® AMPure® XP reagent	50 μ L
Total volume	100 μ L

ポイント

4°Cまたは-20°Cで72時間まで保存可能です

20. Vortexし、ビーズとDNAを結合させるために、室温5-15minで静置

21. プレート/チューブをマグネットの上に置き、溶液がクリアになるまで静置して上清を注意深く取り除いてください

22. 80% EtOH, 200 μ Lを加えてビーズを洗浄する(2回)

23. ビーズを室温3-5minでDry up

24. Elution buffer(10mM Tris-HCl pH8.0-8.5)をいれ、室温2min静置し、上清を回収する

ポイント

・ターゲットキャプチャーの場合はPCR-grade waterを使用推奨
・4°Cまたは-20°Cで1-2週間保存可能です
・ポイントDry upしすぎると、DNAの収量が落ちることがあります

Target Capture or
Sequencing

Library増幅とAMPure精製後のサイズ分布結果

● GC含量が異なるバクテリアゲノムDNAの断片化結果 (ライブラリ増幅後)

UC Davis School of Veterinary Medicine & 100K Pathogen Genome Project Application Noteデータ

Kapa Biosystems社 Application Note

「A novel, single-tube enzymatic fragmentation and library construction method enables fast turnaround times and improved data quality for microbial whole-genome sequencing」より引用

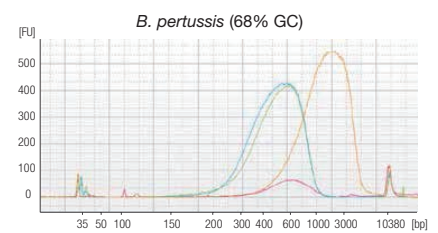
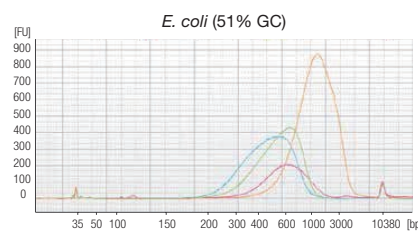
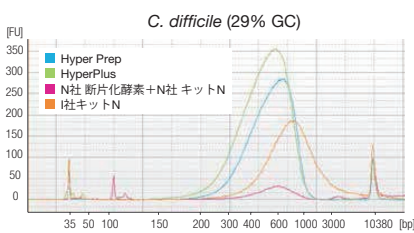
KAPA HyperPlus Kit断片化条件

Input DNA量: 1ng

反応温度: 37°C

反応時間: 5min

断片化時間: 5min Target size: 600bp



Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit(Agilent Technologies)を用いて測定

●結果 異なるGC含量のバクテリアのゲノムDNAもKAPA HyperPlus Kitを用いることによって、目的サイズに断片化できた

● 様々な大きさのDNA(大腸菌ゲノム・ヒトゲノム・PCR増幅産物1.8kb)の断片化結果

Kapa Biosystems社 社内評価データ

精製方法

Human: Purified, high quality human genomic DNA from Coriell (DNA sample NA12878)

E. coli: Purified, high quality E. coli genomic DNA from ATCC (Accession number 700926D-5)

PCR product: generated in a standard PCR, and purified using SPRI beads

KAPA HyperPlus Kit断片化条件

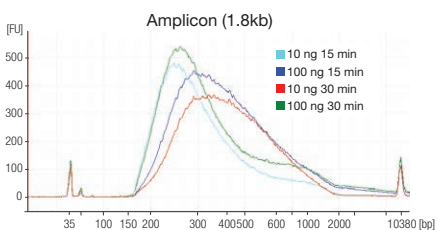
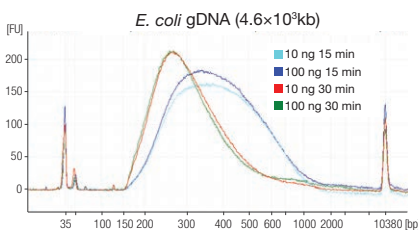
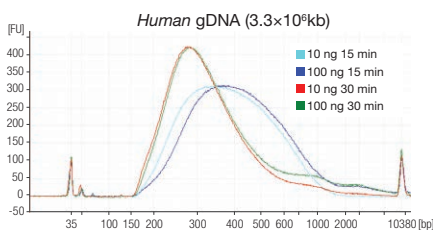
Input DNA量: 10ng, 100ng

反応温度: 37°C

反応時間: 15min, 30min

断片化時間: 15min Target size: 200~350bp

断片化時間: 30min Target size: 150bp



Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit(Agilent Technologies)を用いて測定

●結果 異なる大きさのDNAもKAPA HyperPlus Kitを用いることによって、目的サイズに断片化できた

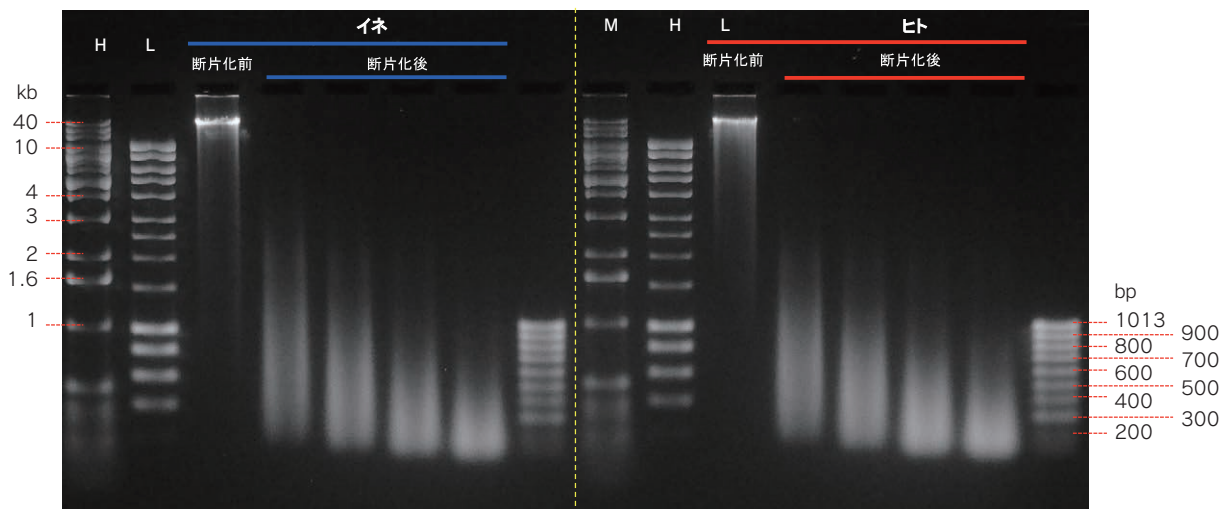
断片化後のサイズ分布結果 ※AdapterをLigationせずに、断片化後、熱変性により反応を中断

 ● Plant genomic DNAとHuman genomic DNAの断片化結果
 日本ジェネティクス社 社内ラボ評価試験データ

 KAPA HyperPlus Kit断片化条件
 Input DNA量 : 1ng, 10ng, 100ng, 1000ng
 反応温度 : 37℃
 反応時間 : 5min, 10min, 20min, 30min

Blue : Plant genomic DNA Red : Human genomic DNA

断片化時間/ Input DNA量	5min Target size 600bp	10min Target size 350bp	20min Target size 200bp	30min Target size 150bp
1000ng	 Top peak : 967bp 1147bp	 Top peak : 596bp 515bp	 Top peak : 293bp 217bp	 Top peak : 165bp 169bp
100ng	 Top peak : 808bp 920bp	 Top peak : 388bp 347bp	 Top peak : 181bp 173bp	 Top peak : 117bp 117bp
10ng	 Top peak : 870bp 639bp	 Top peak : 420bp 380bp	 Top peak : 138bp 264bp	 Top peak : 124bp 149bp
1ng	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected

 Bioanalyzerの測定レンジでは「高分子の切れ残りが検出できない可能性」があるため
 パルスフィールド電気泳動を用いて200bp ~ 40kbの広いレンジでサイズ確認した。


断片化時間 5min 10min 20min 30min

断片化時間 5min 10min 20min 30min

泳動レーン :

Lane H : High Marker, Invitrogen社 1kb DNA extension ladder (#10511-021), 2uL/lane

Lane L : Low Marker, Bioline社 HyperLadder 1kb (#BIO-33025), 5uL/lane

Lane M : Bioline社 HyperLadder 100bp (#BIO-33029), 5uL/lane

サンプルレーン : Plant genomic DNA・Human genomic DNA共に1000ng断片化サンプルを用いて200ng/Laneで泳動

パルスフィールド泳動条件

パワーサプライ : SageScience社 Pippin Pulse, 2-50kb program 16hr

泳動時間 : 6hr

泳動槽 : MajorScience社 Midi plus-2, 15x15cm ゲルトレイ

アカコース : FastGene Agarose (#NE-AG02), 1.2% 120ml

泳動バッファー : SageScience社 KBB buffer (#KBB1001), 終濃度x0.5

● 結果ゲノム

DNAの種類(Human・Plant)に関わらず、ほぼ同じサイズ分布が得られた

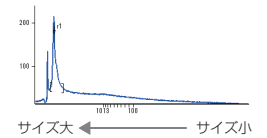
DNAの量(1ng, 10ng, 100ng, 1000ng)に関わらず、ほぼ同じサイズ分布が得られた

時間によって(5min, 10min, 20min, 30min)、ほぼKAPAのTDS通りのサイズ分布が得られた

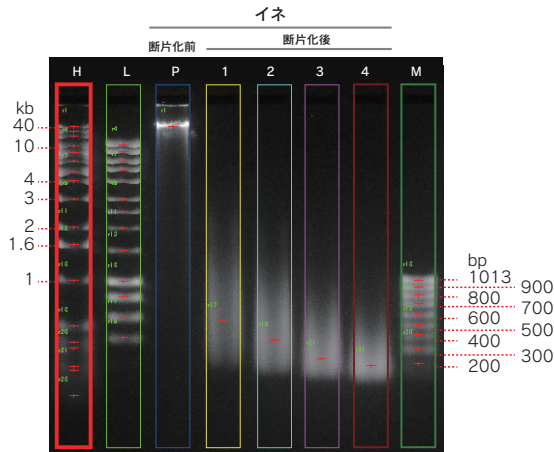
また、Input DNA 1000ngのパルスフィールド電気泳動結果より、KAPA Fragによる断片化後のサンプルには、高分子の切れ残りは認められなかった

● Human genomic DNAとPlant genomic DNAの断片化結果
 日本ジェネティクス社 社内ラボ評価試験データ のつづき・・・
 Gel-Pro Analyzerによる解析 Input DNA量 1,000ng

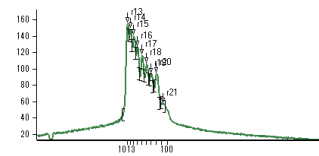
注意
 X軸の値：Gel-Pro Analyzerは、
 Bioanalyzerとは逆



Plant genomic DNA

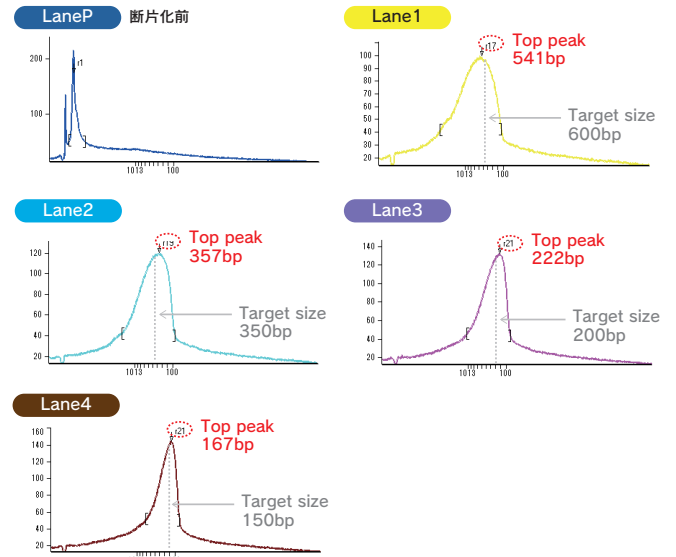


LaneM

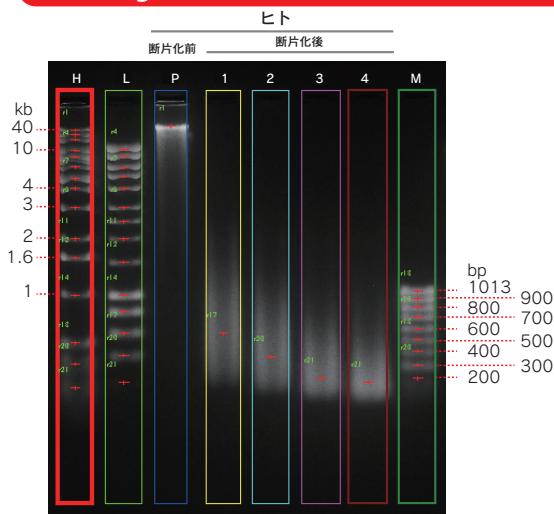


Gel-Pro Analyzer 解析

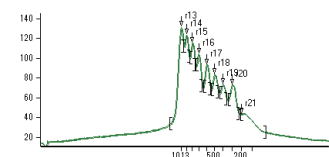
X軸の値：Gel-Pro Analyzerは、Bioanalyzerとは逆



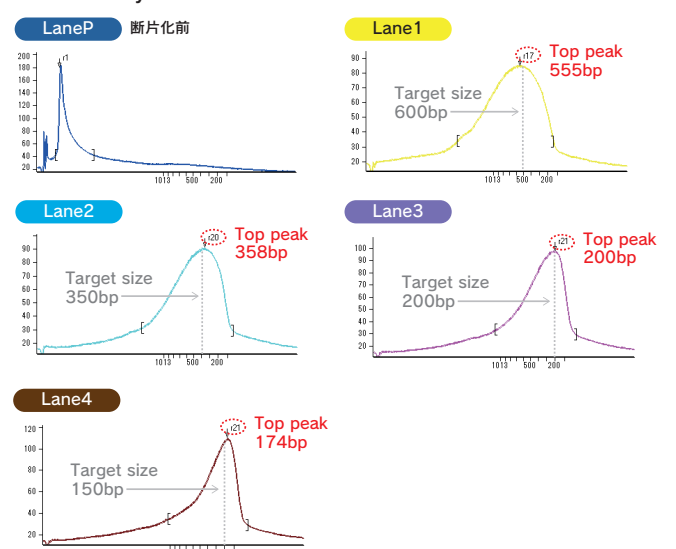
Human genomic DNA



LaneM



Gel-Pro Analyzer 解析



Top peakのsizeの比較(Bioanalyzer: BA Gel-Pro Analyzer: GA)

		5min	10min	20min	30min
Target size		600bp	350bp	200bp	150bp
Plant genomic DNA	BA	967bp	596bp	293bp	165bp
	GA	541bp	357bp	222bp	167bp
Human genomic DNA	BA	1147bp	515bp	217bp	169bp
	GA	555bp	358bp	200bp	174bp

Input DNA1000ngにおいて、KAPA Fragによる断片化後のサンプルに関して、アガロースゲルの解析では目的サイズの位置にピークが確認できた一方、Bioanalyzerは、ゲル解析と比較して、Top Peakサイズが大きすぎて検出される傾向が確認された

参考資料

● Genomic DNAのQuality check

Genomic DNAのQuality を評価するため、吸光度測定とQubit測定を行った

Table 1. 吸光度測定

		Yield	260/280	260/230
Nano photometer (Implen)	Human genomic DNA	195 ng/uL	1.773	2.167
	Plant genomic DNA	570 ng/uL	1.839	2.426

Table 2. Qubit測定

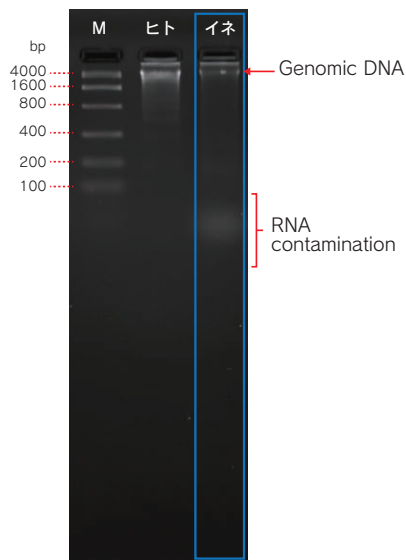
		Yield
Qubit	Human genomic DNA	197 ng/uL
	Plant genomic DNA	235 ng/uL

Table 1.とTable 2.の結果より、Plant genomic DNAは、吸光度測定値(570ng/μL)とQubit測定値(235ng/μL)で約2.4倍の差があった

Plant genomic DNAには、RNA やポリフェノール、糖類がコンタミネーションしている可能性が推察された

⇒ 電気泳動して、バンドを確認することにした

アガロース電気泳動の結果は下記である



Lane M : KAPA Express Ladder (5μL/lane)

ヒト : Human genomic DNA* (Roche #11691112001)

イネ : Plant genomic DNA* (CTAB法)

*泳動量 : 1μg (Qubit の測定値)/lane

[Electrophoresis condition]

3.0% Agarose / TAE

100V

25min

[Staining reagent]

Midori Green Advance DNA stain(Nippon Genetics)

Post Stained, 25μL /100mL TAE

以上の結果により、Plant genomic DNAには、RNAがコンタミネーションしていることが確認されたが、Qubitの測定値を元に、サンプル量を調製し断片化の評価を行った

*Plant genomic DNAは、国立研究開発法人 農業生物資源研究所 イネゲノム育種研究ユニット 主任研究員 堀 清純様のご厚意によりご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

ライブラリー調製に必要な当社取り扱い製品

[KAPA HyperPlus Kit]



KAPA社 ライブラリー調製キット
 KAPA HyperPlus Kit
 KK8510 8回用
 KK8512 24回用
 KK8514 96回用

キット内容

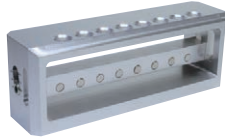
KAPA Frag Enzyme
 KAPA Frag Buffer (10X)
 KAPA Frag Conditioning Solution
 End Repair & A-Tailing Buffer
 End Repair & A-Tailing Enzyme

Ligation Buffer
 DNA Ligase
 KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)
 Library Amplification Primer Mix (10X)

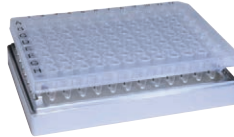
[マグネットスタンド]



MagnaStand (YS-Model)
 8Ch x 0.2ml PCRチューブ用
 FG-SSMAG2



MagnaStand
 8Ch x 1.5mlチューブ用
 FG-SSMAG1.5



MagnaStand (YS-Model) 96wellプレート用
 FG-SSMAG96
 MagnaStand (YS-Model) V2 微量対応モデル
 (AMPure Low Volume Elution 対応マグネット)
 FG-SSMAG96SLV

お客様の声から生まれた、爆発的ヒット商品
 次世代シーケンス (NGS) 用ライブラリー
 調製では、AMPure XPビーズを用いたサン
 プルクリーンアップの工程が何回かあります。
 従来のマグネットスタンドは磁力が弱いた
 め、ピペティングでの溶液ミックスや、溶
 液回収の際のビーズキャリアオーバーが問
 題でした。このマグネットスタンドは、NGS
 ライブラリー調製に特別に開発されており、
 強力な磁力でAMPure XPのハンドリングを
 ストレスなく行うことができます。

[磁気ビーズ]



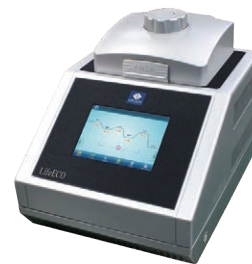
Agencourt® AMPure® XP Kit
 A63880 5mL
 A63881 60mL
 A63882 450mL

[試薬調整チューブラック]



アイスオン1型・2型
 SKIO-1 (169 x 69 x 47)
 SKIO-2 (177 x 95 x 47)

[PCR装置]



LifeECO
 TC-96GHbC

Heat Lid の温度設定が
 可能です。

[消耗品]



0.2mL 8連PCRチューブwithキャップ
 FG-088WD (ドームキャップ)
 FG-088WF (フラットキャップ)

チューブ1個単体で蓋を開閉することができ、
 コンタミネーションを予防します。



マイクロ遠心チューブ
 11150 0.65mL
 11510 1.7mL
 12000 2.0mL



10uL ワンタッチフィルター
 10320

ゴムのような柔らかいプラスチック
 によりピペットへの装置が良く
 高い分注精度が得られます。



200uL マルチガード
 14220

14220T Low Binding (低吸着)

オプション推奨品 全自動ゲル抽出システム (サイズセレクション用)



Sage Science
 BluePippin本体 (17インチモニター、キーボード、マウス付属)
 BLU0001



Sage Science
 SageELF™ 本体一式 (PC、モニター、キーボード、マウス付属)
 ELF0001