

NGS ライブラリー調製キット

KAPA Hyper Prep Kit *for illumina*

FAQ: よくあるご質問



1. illumina 社シーケンサー用 KAPA Hyper Prep Kit の推奨用途は？

- 全ゲノムショットガン法
- Agilent SureSelect、Roche Nimblegen™、illumina® TruSeq™、IDT xGen™ Lockdown™ Probes 等を利用したエクソームまたはカスタムキャプチャーによるターゲットシーケンシング
- アンプリコンシーケンシング
- ChIP-seq 解析
- RNA-seq 解析
- Methyl seq 解析 (KAPA HiFi Uracil+ Library Amplification Ready Mix と併用を推奨)

2. 必要なインプット量は？

本プロトコールでは、ライブラリー作製に用いるサンプルとして、適切に断片化された二本鎖 DNA を 1ng ~1 μg 用いるのが有効とされています。ただし、最終的なライブラリーのカバレッジと複雑性を確保する上で十分なコピー数を含むサンプルであれば、これより少ないインプット量でライブラリーを作製することも可能です。

3. ライブラリー作製プロセスの主な工程は？

- エンドリペア、A テーリング： 末端が修復され、5'末端にリン酸基、3'末端に dA テールを有する二本鎖 DNA 断片を作製します。
- アダプターライゲーション： 3'-dTTP オーバーハングを有する二本鎖 DNA アダプターを、3'-dA テールを有するライブラリー断片にライゲーションします。
- ライブラリー増幅 (オプション)： 正確性が高くバイアスの少ない PCR により、両端に適切なアダプター配列を有するライブラリー断片を増幅します。

4. ライブラリー作製プロセスの途中で作業を中断しても大丈夫ですか？

経験やサンプル数にもよりますが、ライブラリー作製の全工程（エンドリペア、A テーリングから最終的なライブラリー増幅まで）は3時間以内に完了できます。プロトコールの途中で作業を中断したい場合は、ライゲーション後の精製が完了した後、もしくはライブラリー増幅直後（精製前）であれば中断しても問題ありません。

アダプター付加済みのライブラリーは、4°Cで1週間または-20°Cで1ヶ月以上保存でき、その後増幅、ターゲットエンリッチメント、シーケンシングに使用できます。DNAの分解を防ぐため、必ずバッファー（10 mM Tris-HCl、pH 8.0）中で保存し、凍結融解の繰り返しはできるだけ避けて下さい。

5. 断片化処理の推奨条件は？

- 断片化処理とエンドリペアの間に精製を行う場合は、TE バッファー（10 mM Tris-HCl（pH 8 または 8.5） + 1 mM EDTA）中で断片化を行って下さい。
- 断片化処理とエンドリペアの間に精製を行わない場合は、Low TE バッファー（10 mM Tris-HCl（pH 8 または 8.5） + 0.1 mM EDTA）中で断片化を行って下さい。

（注意） PCR grade water など、水を用いて DNA の断片化を行わないで下さい。

6. 本キットに使用できるアダプターは？その濃度は？

本プロトコールの有効性が確認されているのは、インデックス付きの illumina® TruSeq™、Roche Nimblegen SeqCap EZ 及び Agilent SureSelectXT2 アダプターですが、これ以外でも、同様の設計を有するアダプターであれば本キットに使用できます。

アダプター：インサートのモル比が 10:1 から >100:1 の範囲にあるとき、良好なライゲーション効率が得られます。様々なインプット DNA 量に対する推奨アダプター濃度については下表をご参照下さい。

表 1 1 ng～1 μg のインプット DNA からライブラリーを作製する際の推奨アダプター濃度

インプット DNA 量	アダプターストック濃度	最終アダプター濃度
50 ng～1 μg	15 μM	680 nM
25 ng	7.5 μM	340 nM
10 ng	3 μM	136 μM
5 ng	1.5 μM	68 nM
2.5 ng	750 nM	34 nM
1 ng	300 nM	14 nM

インプット量が少ないアプリケーションでは、「アダプター：インサート」のモル比が大きい方が有利です。25 ng 以下のインプット DNA 量に合わせてワークフローを最適化する際は、2~3 の異なるアダプター濃度を検証することをお勧めします。推奨アダプター濃度（表 1）と、その 2~10 倍の濃度を 1~2 試してみてください。

7. FFPE サンプルを使用する場合に推奨されるワークフローはありますか？

特にありません。標準プロトコールに従ってターゲットキャプチャー用 FFPE ライブラリーを作製して下さい。WGS ワークフローでは、恐らくサイズセレクションが必要になるでしょう。

8. 断片化 DNA のアダプター付加済み DNA への変換率は？

断片化 DNA のアダプター付加済み DNA への変換率は、インプット量が少ないほど低くなります。ライブラリー作製の最初の工程（エンドリペア、A テーリング）で >10 ng の断片化ゲノム DNA から始めると、通常はインプット DNA の 5% から 35% がアダプター付加済み DNA として回収されます。ライブラリー増幅の前に SPRI[®] 精製の回数を増やしたり、サイズセレクションを実施すると、アダプター付加済み DNA の収量が低くなる傾向があります。

9. アダプターライゲーション後、SPRI 精製を何回実施すればよいですか？

新たに開発された one-tube KAPA Hyper Prep ケミストリーが、アダプターダイマー形成やキャリーオーバーの頻度を軽減してくれますので、アダプターライゲーション後、SPRI 精製を 1 回行えば、未反応のアダプターやアダプターダイマーは十分除去されます。インプット量が少ないアプリケーションで推奨される高い「アダプター：インサート」モル比でも、十分除去が可能です。

10. 本プロトコールはサイズセレクションにも対応していますか？

必要に応じて、一般的手法によるサイズセレクション（デュアル SPRI、電気泳動法など）をプロトコールに組み込むことが出来ます。

- ワークフロー全体を通して、サイズセレクションを実施できるポイントはいくつかあります。例えば：
- 断片化 DNA のエンドリペアの前
- ライゲーション後精製の後
- ライブラリー増幅の後

KAPA Hyper Prep の標準プロトコールにはサイズセレクション工程は含まれていません。ライブラリー作製前、ライゲーション後、あるいはライブラリー増幅後にデュアル SPRI サイズセレクションを実施する場合の詳細な手順については、KAPA Hyper Prep のテクニカル・データ・シートの Appendix をご覧下さい。

11. 増幅に使われている酵素は何ですか？

KAPA Hyper Prep Kit は、ライブラリー増幅試薬として KAPA HiFi HotStart ReadyMix を含んでいます。この試薬には、増幅時のバイアスが少なく、効率的で正確性が高い KAPA 社エンジニア酵素 (B ファミリー HiFi HotStart DNA ポリメラーゼ) が含まれています。KAPA HiFi は、NGS ライブラリー増幅に理想的な酵素です (1、2、3、4)。

1. Oyola, S.O. et al. *BMC Genomics* **13**, 1 (2012)
2. Quail M.A. et al. *Nature Methods* **9**, 10–11 (2012)
3. Quail M.A. et al. *BMC Genomics* **13**, 341 (2012)
4. Ross, M.G. et al. *Genome Biology* **14**: R51 (2013)

12. ライブラリー増幅の最適なサイクル数は？

最後まで増幅させた場合 (**推奨されていません**)、1 回の 50 μ L KAPA HiFi ライブラリー増幅反応により 8~10 μ g の増幅ライブラリーが得られます。過剰増幅及びそれに伴い生成される望ましくない副産物を最小限に抑えるには、下流プロセスの実施に最適なライブラリー量が増幅されるよう、サイクル数を調節する必要があります。最適な最終ライブラリー量は通常 250 ng から 1.5 μ g です。

ライブラリー増幅の前にアダプター付加済みのライブラリーを定量することで、最適な増幅条件を見出すことが可能になります。特に、新たなライブラリー作製ワークフローを確立したり最適化する際に有効です。ライブラリー増幅に利用可能な鋳型 DNA (アダプター付加済み DNA) の量は、KAPA Library Quantification Kit で測定できます。測定結果に簡単なアルゴリズムを適用することで、特定のライブラリー量を得るために必要な増幅サイクル数を理論的に推定することが出来ます。

様々なインプット DNA 量からライブラリーを作製する際に必要な増幅サイクル数の推定値を、以下の表に示しました。サンプルの種類やインプット DNA のサイズ分布によっては、**実際に**最適なサイクル数が推定値より 1~3 サイクル多くまたは少なくなる場合があります。

表 2 1 ng~1 μ g のインプット DNA から、100 ng または 1 μ g の DNA に増幅するための推奨サイクル数

インプット DNA 量 ¹	100ng または 1 μ g の DNA に増幅するために必要なサイクル数	
	100 ng	1 μ g
1 μ g	0~1	2~3
500 ng	0~1	3~4
250 ng	1~3	4~6
100 ng	3~4	6~7
50 ng	4~5	7~8
25 ng	5~7	8~10
10 ng	8~11	11~14
5 ng	10~13	13~16
2.5 ng	12~14	15~17
1 ng	14~16	17~19

¹ エンドリペア・A テーリング反応でのインプット DNA

13. ライブラリー増幅は必須ですか？

ライゲーション後の精製実施後に回収されたアダプター付加済みのライブラリーが、次のプロセス（ダイレクトシーケンシングなど）を実施する上で十分量であり、かつライブラリーがそのプロセスに必要なアダプターをすべて有していれば、ライブラリー増幅を省略しても構いません。ワークフローがさらに簡素化され、ライブラリー作製の所要時間が 2 時間以内に短縮されます。KAPA Hyper Prep Kit は高い転換率を誇るため、最小 100 ng のインプット DNA 量で PCR フリーのワークフローを実現可能です。PCR フリーワークフロー向けに、増幅試薬を含まない KAPA Hyper Prep Kit (KK8501、KK8503 及び KK8505) もあります。

14. KAPA Library Amplification Primer Mix はすべての illumina ライブラリーに対応していますか？

KAPA Hyper Prep Kit には、新たに最適化された Library Amplification Primer Mix が含まれており、KAPA HiFi DNA ポリメラーゼによるライブラリー増幅反応中のプライマー枯渇を防止します。ミックス中に含まれるプライマーは illumina® フローセル配列 P5 及び P7 を保有しており、完全なアダプター配列を付加されたライブラリーの増幅に適しています。また、キット以外のプライマーミックスも、不完全またはカスタムアダプターと組み合わせて使用できます。

15. ライブラリーの過剰増幅を検出するにはどうすればよいでしょう？

ライブラリー増幅反応では、通常、dNTP より先にプライマーが枯渇します。基質の枯渇によりそれ以上 DNA 合成が行われなくなると、その後の DNA 変性やアニーリングステップで相補鎖が分離し、非相補鎖への不完全なアニーリングが起こります。異常アニーリングの結果、部分的に二本鎖を形成するヘテロ二本鎖 DNA が大量に集まり、いわゆる「daisy-chains」や「tangled knots」が形成されます。このような DNA は泳動速度が遅いため、増幅されたライブラリーを電気泳動で解析すると、高分子量の位置に二次的なピークとして検出されます。

16. 過剰増幅はどのような影響をもたらしますか？

ライブラリーの過剰増幅は、PCR デュプリケーション、ライブラリーインサートのキメラ化、増幅バイアスやヘテロ二本鎖 DNA の形成など、望ましくない副産物を生じてしまいます。QC やシーケンシングを行うのに十分なライブラリー量は確保しつつ、できるだけ増幅を抑えることが好ましいです。

17. 調製されたライブラリーの品質を評価する方法は？

電気泳動により、ライブラリーのサイズ分布、及びプライマーダイマーや過剰増幅産物の有無を確認します。ターゲットキャプチャーやシーケンシングのためにプールする前に、KAPA Library Quantification Kit で qPCR を行いライブラリーを定量することをお勧めします。アダプター付加済みのライブラリー（ライブラリー増幅前）を qPCR で定量することは、プロトコールの最適化やトラブルシューティングにも有効です。

18. KAPA Hyper Prep Kit の使用期限は？推奨される保存条件は？

本キットに含まれている酵素は温度に敏感ですので、輸送及び保存の際は適切な温度管理が必要です。KAPA Hyper Prep Kit は、送り先によってドライアイスやアイスパック等を同梱して出荷されます。受領後、酵素及び反応バッファーを直ちにフリーザーに入れ、 -20°C で保存して下さい。保存条件を守って適切に扱えば、ラベルに記載された使用期限（出荷日から 12 ヶ月後）までキット内容物の活性が落ちることはありません。