

GenNext[®] NGS Library Quantification Kit

(Code No. NLQ-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A5423K

— 目 次 —

[1] はじめに	1
[2] 製品内容	2
[3] 製品のほかに用意するもの	4
[4] ライブラリーの希釈	4
[5] 使用方法	6
[6] データ解析	7
[7] トラブルシューティング	8
[8] 関連商品	9

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

※illumina[®] は、illumina Inc.の登録商標です。

※SYBR[®]、Qubit[®]、Applied Biosystem[®]、NanoDrop[™]、StepOne[™]、StepOnePlus[™]は、Thermo Fisher Scientific K.K.の登録商標または商標です。

[1] はじめに

GenNext[®] NGS Library Quantification Kit は illumina[®]次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットです。illumina[®]が採用している P5、P7 アダプター配列に対応しており、フローセル上に結合できるライブラリーのみを特異的、かつ正確に定量します。

本キットには長鎖や GC リッチターゲットの定量に定評のある KOD SYBR[®] qPCR Mix を採用しています。

◆本製品の特長◆

1. 低バイアスで正確な定量

KOD SYBR[®] qPCR Mix を採用しており、ライブラリーの GC 含量やサイズに影響を受けにくく、どのようなライブラリーにおいても正確な定量値を得ることができます。本製品で定量した値を用いることで、安定したクラスター密度を実現することができます。

2. 幅広いレンジで定量可能

20 pM から 0.0002 pM までの 6 種類の濃度の Standard DNA を用意しており、幅広いレンジで正確に定量することができます。

3. 簡便

本製品はライブラリー定量に必要なすべての試薬(qPCR 試薬、Primer Mix、Standard DNA、およびライブラリーの希釈バッファー)を含み、容易にライブラリーの定量を行うことができます。

KOD SYBR[®] qPCR Mix について

KOD SYBR[®] qPCR Mix は 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を除去した KOD exo(-) DNA polymerase と、最適化されたバッファー条件を組み合わせた高性能な SYBR[®] Green I アッセイ用のマスターミックス試薬です。KOD の優れた合成能を最大限に引き出すことで、GC 含量が 80%を超えるような GC リッチなターゲットや長鎖ターゲット(~2kb)の定量的な増幅においても安定したリアルタイム PCR 測定が可能になります。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

・KOD SYBR[®] qPCR Mix*

パーツ名	内容量	保存温度
KOD SYBR [®] qPCR Mix	5ml (1.67ml × 3)	-20°C (または 2~8°C で 3ヶ月以内) 遮光保存
50 × ROX reference dye	250 µl	-20°C (または 2~8°C) 遮光保存

* KOD SYBR[®] qPCR Mix(code No. QKD-201)が提供されます。

・Standard & Primer Set

パーツ名	内容量	保存温度
Standard DNA 1 (20 pM)	200 µl	-20°C
Standard DNA 2 (2 pM)	200 µl	-20°C
Standard DNA 3 (0.2 pM)	200 µl	-20°C
Standard DNA 4 (0.02 pM)	200 µl	-20°C
Standard DNA 5 (0.002 pM)	200 µl	-20°C
Standard DNA 6 (0.0002 pM)	200 µl	-20°C
5 × Primer Mix	2 ml (1 ml × 2)	-20°C
50 × Dilution Buffer	1.7 ml	-20°C

KOD SYBR[®] qPCR Mix

- ・反応バッファー、SYBR[®] Green I、dNTPs、Mg²⁺、KOD exo(-) DNA polymerase および、抗 DNA polymerase 抗体などを含む 2 × 濃度のプレミックス溶液です。
- ・ROX (passive reference dye)は含まれておりません。
- ・製品到着後は、-20°C で保存してください。
- ・初回使用時は、融解させた後、ゆるやかに転倒混和し、溶液を完全に均質化した上でご使用ください。その後は、3ヶ月以内を目安として、2~8°C で冷蔵保存することができます。
- ・長期間使用しない場合は、-20°C で再度保存してください。10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことを確認しています。
- ・SYBR[®] Green I の蛍光劣化を防ぐため、保存の際は遮光してください。

50 × ROX reference dye

- ・Applied Biosystems[®] 機器、Agilent Technologies 社製機器など、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のため、パッシブリファレンスを用いる機器での反応の際に添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量については、p.6 [5] 使用方法 (1) 反応液の調製の項目をご覧ください。
- ・パッシブリファレンスによる補正を行わない機器では添加する必要はありません。

- ・-20°C または 2~8°C で遮光保存してください。
- ・長期間使用しない場合は、-20°C で凍結保存してください。

※ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50×ROX reference dye をあらかじめ KOD SYBR[®] qPCR Mix へ混合して保存することもできます。混合後はゆるやかに転倒混和し、上記の KOD SYBR[®] qPCR Mix の保存条件に従って保存してください。混合比率は以下の通りです。ROX 濃度については、p.6 [5] **使用方法 (1) 反応液の調製**の項目をご覧ください。

ROX を 1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 66.8μl

ROX を 0.1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 6.7μl

Standard DNA

Standard DNA として 6 段階の 10 倍希釈系列 (20~0.0002pM) が提供されます。Standard DNA は illumina[®] 次世代シーケンサー用のライブラリーで用いられる P5、P7 配列を含み、増幅サイズは 452 bp となります。illumina[®] 以外の次世代シーケンサー用に調製されたライブラリーは定量することができませんのでご注意ください。

5×Primer Mix

プライマーは illumina[®] 次世代シーケンサー用ライブラリーの P5、P7 配列にアニーリングするように設計された以下の配列を用いています。

Primer Forward : 5'- ATA CGG CGA CCA CCG AGA TC -3'

Primer Reverse : 5'- CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA G -3'

※5×Primer Mix、50×ROX reference dye および滅菌水をあらかじめ KOD SYBR[®] qPCR Mix へ混合し、ライブラリーもしくは Standard DNA を 4μl 添加するだけで使用できるマスターミックスとして保存することもできます。混合後はゆるやかに転倒混和し、上記の KOD SYBR[®] qPCR Mix の保存条件に従って保存してください。混合比率は以下の通りです。ROX 濃度については、p.6 [5] **使用方法 (1) 反応液の調製**の項目をご覧ください。

ROX を 1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX : 5×Primer Mix : 滅菌水 = 800μl : 32μl : 320μl : 128μl

ROX を 0.1×濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50×ROX : 5×Primer Mix : 滅菌水 = 800μl : 3.2μl : 320μl : 156.8μl

ROX を使用しない場合

qPCR Mix : 5×Primer Mix : 滅菌水 = 800μl : 320μl : 160μl

50×Dilution Buffer

50×Dilution Buffer を滅菌水で 50 倍に希釈してライブラリーの希釈に使用します。希釈後の 1×Dilution Buffer は 4°C で保存してください。

1×Dilution Buffer 組成は次の通りです : 10mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA、0.1% Tween20

1×Dilution Buffer はライブラリー定量の希釈にのみご使用ください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。

(1) リアルタイム PCR 装置

本製品は、一般的なブロックタイプ、高速タイプ、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用いただけます。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

(2) ライブラリーサンプル

illumina[®]次世代シーケンサー用に調製されたライブラリーサンプル。

[4] ライブラリーの希釈

(1) 1 × Dilution Buffer の調製

50 × Dilution Buffer を滅菌水で 50 倍に希釈し 1 × Dilution Buffer を調製します。

1 × Dilution Buffer 組成は次の通りです：10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA、0.1% Tween20

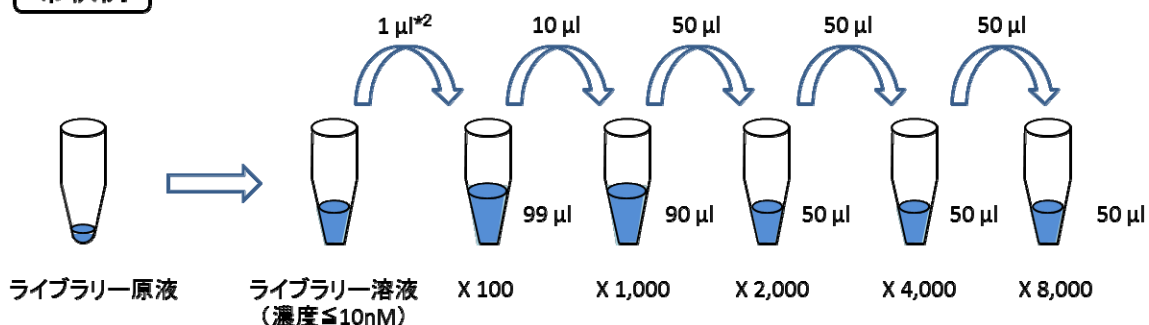
1 × Dilution Buffer はライブラリー定量の希釈にのみご使用ください。

(2) ライブラリーの希釈

1 × Dilution Buffer を使用し、Standard DNA1~6 の範囲内(20~0.0002 pM ≒ 5.5~0.000055 pg/μl)に入るようにライブラリーサンプルを希釈します。ライブラリーはあらかじめ 1 × Dilution Buffer で 10nM^{*1} 以下(または 2.7ng/μl 以下)に希釈してください。10nM 以下に希釈したライブラリーは 1 × Dilution Buffer を用いて 100 倍、続いて 1,000 倍に希釈した後に、2 倍希釈を繰り返し、2,000 倍、4,000 倍、8,000 倍まで希釈します。

1,000、2,000、4,000、8,000倍希釈したライブラリーを定量に使用します。また、状況に応じて、これら倍率の前後の希釈系列を作製して、定量にご使用ください。

希釈例



*1:ライブラリーを 10nM 以下にする際、NanoDrop[™]、Qubit[®]、または Bioanalyzer 等の値を参考に希釈してください。測定値から濃度を求める目安として、ライブラリーの平均鎖長が 450bp の場合、2.7ng/μl はおよそ 10nM に相当します(ライブラリーの平均鎖長が半分の 225bp の場合、2.7ng/μl はおよそ 20nM(10[nM] × 450[bp]/225[bp])に相当します)。また、同様な実験を過去に行ったことがある場合、その時の結果も参考に希釈を行ってください。

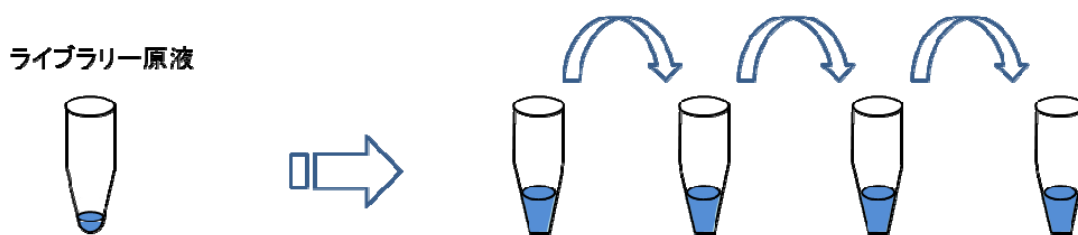
*2:1μl 前後の量のピペッティングは分注精度に細心の注意を払ってください。

参考となるものがなく、ライブラリー濃度を推定できない場合は、表1を参考に希釈してください。

表1

ライブラリータイプ	希釈方法の最初の選択
PCRを介して調製されたライブラリー (Whole Genome Seq、ChIP-Seq、RNA-seqおよびアンプリコンシーケンス用ライブラリーなど)	・最初に10,000、20,000、40,000、80,000倍希釈をお試しください。
ターゲットキャプチャーで調製されたライブラリー	・最初に100,000、200,000、400,000、800,000倍希釈をお試しください。
PCRを介さずに調製されたライブラリー (Whole Genome Seq用ライブラリーなど) (1) 100ng～1μgでインプットしたDNAから調製したライブラリー (2) 10～100ngでインプットしたDNAから調製したライブラリー (3) 10ng以下で調製されたライブラリー	(1) 最初に5,000、10,000、20,000、40,000倍希釈をお試しください。 (2) 最初に100、200、400、800倍希釈をお試しください。 (3) 最初に2、4、8倍希釈をお試しください。

希釈例(表1)



PCRを介して調製されたライブラリー		X 10,000	X 20,000	X 40,000	X 80,000
ターゲットキャプチャーで調製されたライブラリー		X 100,000	X 200,000	X 400,000	X 800,000
PCRを介さずに調製されたライブラリー	(1)	X 5,000	X 10,000	X 20,000	X 40,000
	(2)	X 100	X 200	X 400	X 800
	(3)	X 2	X 4	X 8	

[5] 使用方法

(1) 反応液の調製

以下に、20 μ l 反応時の調製例を示します。使用するリアルタイム PCR 機器の特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	20 μ l 反応
KOD SYBR [®] qPCR Mix	10 μ l
50 \times ROX reference dye	0.4 / 0.04 ^{*1} μ l
5 \times Primer Mix	4 μ l
希釈したライブラリー / Standard DNA	4 μ l
滅菌水	1.6 / 1.96 μ l
合計	20 μ l

*1: Applied Biosystems[®] 機器、Agilent Technologies 社製機器などでは、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを用います。これらの機器での反応の際に ROX reference dye を添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量は以下の通りです。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。

主な機器の最適な ROX reference dye 濃度

機器	最終濃度 (添加量)
Applied Biosystems [®] 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ など	1 \times (1/50 量)
Applied Biosystems [®] 7500、7500Fast、Agilent Technologies 社製機器(オプション)など	0.1 \times (1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、BioFlux LineGene など	不要

ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50 \times ROX reference dye をあらかじめ、下記の混合比率で KOD SYBR[®] qPCR Mix へ混合して保存することもできます。

ROX を 1 \times 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 \times ROX = 1.67ml : 66.8 μ l

ROX を 0.1 \times 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 \times ROX = 1.67ml : 6.7 μ l

(2) PCR サイクル条件設定

各機器の手順に従い、以下のサイクル条件を設定してください。融解曲線解析の設定は、各機器の標準設定に従ってください。詳しくは、各機器の取扱説明書をご覧ください。

初期変性：	98°C, 2 min. *1	
変性：	98°C, 10 sec.	} 35 cycles
アニーリング：	65°C, 10 sec.	
伸長：	68°C, 30 sec. *2	
融解曲線解析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)		

*1: 本製品では抗体を用いるホットスタートシステムを採用しているため、98°C、2min.の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

*2: 600bp 以上のライブラリーの場合、45 sec.に設定ください。

[6] データ解析

(1) ライブラリー濃度の求め方

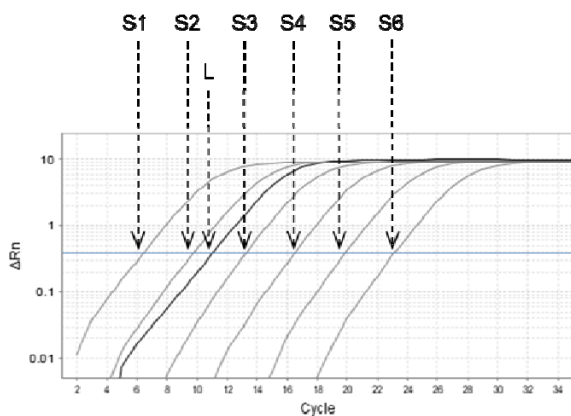
測定で得られた Standard DNA の Ct 値をプロットして、検量線を作成します。明らかな異常値と考えられる Ct 値は除外してください。

検量線は下図のように濃度(20 pM ~0.0002 pM)の対数值(X 軸:log₁₀ スケール)と測定で得られた Ct 値(Y 軸)から作成します。ライブラリー希釈液から得られた Ct 値を使用し、作成した検量線からライブラリー濃度(pM)を算出します。

上記で算出された濃度は Standard DNA 断片長 452bp を基準とした値であるため、断片長が異なるライブラリーは補正が必要となります。補正には下記の式を使用します。

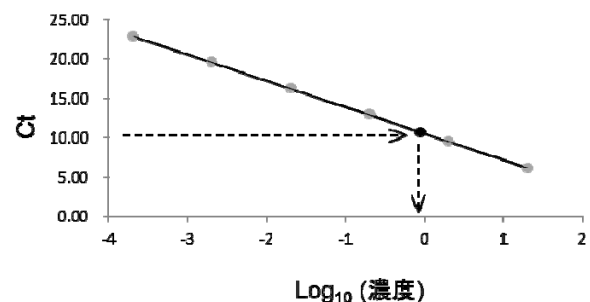
$$\text{ライブラリー濃度 (nM)} = \frac{[\text{算出されたライブラリーサンプル濃度 (pM)}] \times 452\text{bp (Standard DNA 断片長)} \times \text{希釈倍率}}{1000 \times [\text{ライブラリーサンプル平均断片長 bp}]}$$

その際の Ct 値は検量線の範囲内に入っている最も希釈率の小さいライブラリーから得られたものを採用してください。



S: Standard DNA

L: ライブラリーサンプル



(2) 融解曲線解析

融解曲線で明らかに非特異増幅が生じた際、サイクル条件を p.7 [5] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定のサイクルから以下のサイクルに変更することで反応特異性が改善することがあります。

初期変性：	98°C, 2 min.	
変性：	98°C, 10 sec.	← 35 cycles
伸長：	68°C, 30 sec.	
融解曲線解析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)		

また、融解曲線で82°C付近にピークがある場合、アダプターダイマーによるピークである可能性があります。アダプターダイマーはライブラリー調製時のライゲーションの際に、アダプター同士が結合することで生じます。Bioanalyzerなどの電気泳動装置もしくはゲル電気泳動によりアダプターダイマー(およそ120bp)があるかどうか確認してください。アダプターダイマーがライブラリーに混在すると定量値のずれが生じ、定量値の正確性が担保されません。アダプターダイマーが確認された場合、ライブラリーを再度精製し、除去することをお勧めします。

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
次世代シーケンサーでのクラスター密度が低い、もしくは高い	検量線の作成方法に問題がある	・明らかに異常値と考えられるような Ct 値は外して計算を行ってください。 ・適切な Threshold を設定してください。
	反応液の調製方法に問題がある	反応液調製時および Standard DNA 添加時にピペティングを十分行ってください。
	ライブラリーの希釈が不適切	Standard DNA1~6 の範囲内(20~0.0002pM)に入るようにライブラリーを希釈してください。 Standard DNA1~6 の範囲から外れた Ct 値を定量値の算出に利用した場合、定量値の正確性が担保されません。
	非特異増幅が生じている	p.8 [6] データ解析 (2) 融解曲線解析を参照してください。
	アダプターダイマーが含まれている	p.8 [6] データ解析 (2) 融解曲線解析を参照してください。アダプターダイマーがある場合、定量値のずれが生じ、定量値の正確性が担保されません。
Standard DNA のみ増幅され、ライブラリーの増幅がみられない	本製品がライブラリーに適さない	本製品は illumina [®] P5、P7 アダプター配列を含むライブラリーのみ定量することができます。 illumina [®] 以外の次世代シーケンサー用に調製されたライブラリーは定量することができません。

現象	原因	対策
増幅曲線の蛍光シグナルが弱い、または増幅曲線の形状が滑らかでない	ROX reference dye の量が過剰	パッシブリアレンスを使用する機器において、ROX reference dye の量が過剰である場合、蛍光量補正時に SYBR [®] Green I の蛍光値が低く見積もられることがあります。p.6 [5] 使用方法 (1) 反応液の調製に従い、50×ROX reference dye の添加量を確認してください。
	蛍光測定時間が短い	一部の機器では、PCR の伸長時間が短すぎる場合、蛍光測定が不十分になる場合があります。増幅曲線のがたつきが目立つ場合には、伸長時間を長め(45~60 秒)に設定することで、改善される場合があります。
	反応液量が少ない	機器の推奨反応液量以下の液量で反応を行った場合、蛍光測定値の誤差が増大する傾向があります。液量を増やして反応を行ってください。

[8] 関連商品

高効率 SYBR[®] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
SYBR [®] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 KOD SYBR[®] qPCR Mix	1ml × 1 (40 回用)	QKD-201T
	1.67ml × 3 (200 回用)	QKD-201

※KOD SYBR[®] qPCR Mix では、50×ROX reference dye が別容器で添付されます。

※容量は、50μl 反応の場合の反応回数です。

※1000 回用の QKD-201 × 5 (QKD-201 の 5 セット組) もご用意しています。

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://lifescience.toyobo.co.jp/>



【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>