



GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-

(Code No. LPK-201, LPK-201T, LPK-201L)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

— 目 次 —

[1] はじめに	2
[2] 製品内容	4
[3] 製品のほかに用意するもの	5
[4] 実験のコツ(Tips)	6
[5] 使用方法	7
A. 末端平滑化を実施する場合(超音波断片化／酵素断片化DNA)	9
B. 末端平滑化を実施しない場合(PCR断片等)	13
C. ライブラリー増幅を実施しない場合(PCR free)	16
[6] 実施例	20
[7] トラブルシューティング	25
[8] 関連商品	28

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、食品、化粧品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するとともに SDS を参照し、安全に留意してください。

※本資料に掲載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

[1] はじめに

GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- (Code No. LPK-201, LPK-201T, LPK-201L) は、断片化された 2 本鎖 DNA (超音波断片化/酵素断片化ゲノム DNA 等) や PCR 産物等から、illumina® 次世代シーケンサー用ライブラリーを簡便かつ迅速に調製することを目的に開発されたキットです。ライゲーション後 (アダプター付加反応)、ライブラリー増幅前の精製工程を省略することで、Hands-on time の大幅な削減を実現しました (図 1)。

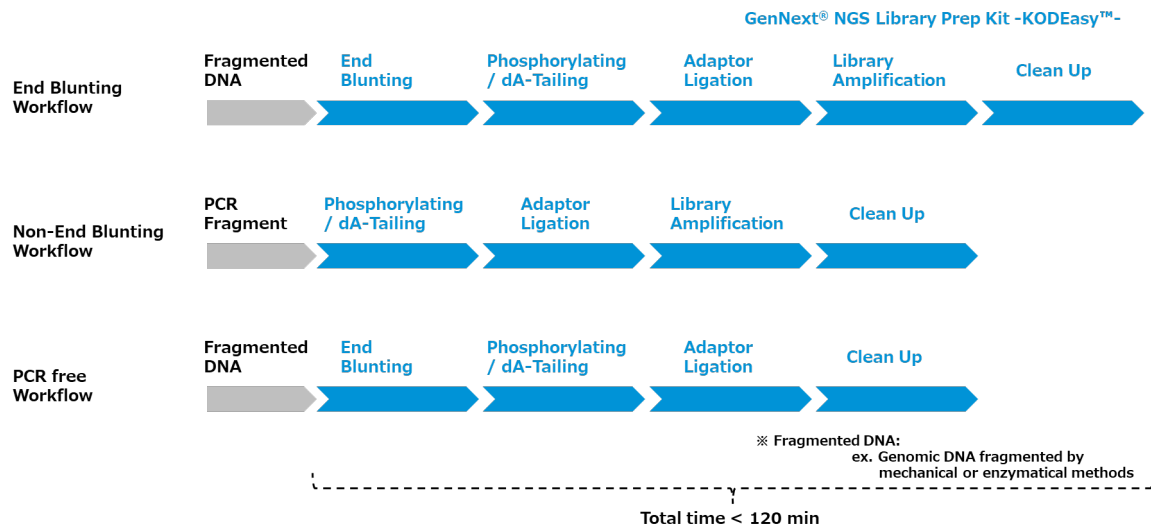


図 1. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- workflow

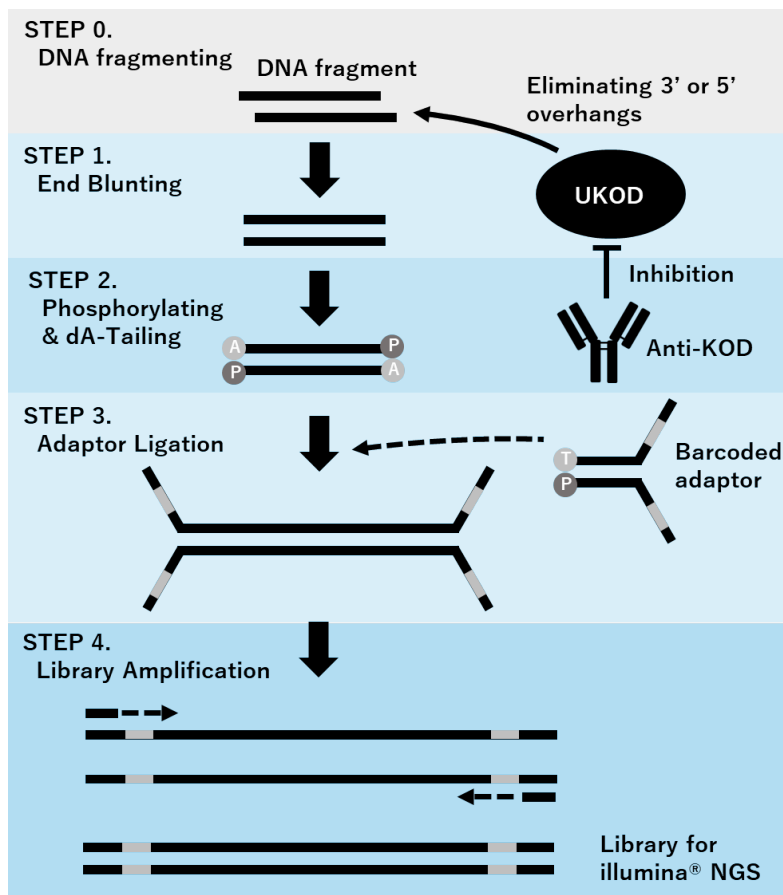


図 2. Molecular mechanism of GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-

ライブラリー調製原理 (図 2)

(STEP 1.) 高耐熱性・高正確性・増幅効率をもつ改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)を末端平滑化酵素に使用し、DNA 末端の平滑化を実施。

(STEP 2.) UKOD の Polymerase 活性と 3' → 5' Exonuclease 活性を高効率的に抑える 2 種類のモノクローナル抗体による阻害、および 5' リン酸化/dA 付加を同時に実施。

(STEP 3.) 標的 DNA の A 突出末端、およびアダプター核酸の T 突出末端に対する末端平滑化酵素による末端平滑化が抗体により阻害されることでアダプターダイマーの生成を抑制、アダプターライゲーションを効率的に実施。

(STEP 4.) 高正確性・増幅効率をもつ UKOD、および Polymerase 活性と 3' → 5' Exonuclease 活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体を用いた特異性の高い Hot start PCR によりライブラリー増幅を実施。

PCR 断片の調製、及び精製ライブラリーの再増幅には弊社 PCR 試薬で KOD DNA polymerase、及びその改変体を使用している以下の製品等のご使用をお勧めします([8]関連商品をご参照ください)。

- ・ KOD One[®] PCR Master Mix (Code No. KMM-101)
- ・ KOD -Multi & Epi-[®] (Code No. KME-101)
- ・ KOD FLEX[™] PCR Master Mix (Code No. KMX-101)

◆本製品の特長◆

1. 簡便かつハイスループットなライブラリー調製ワークフロー

GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-はライゲーション後のビーズ精製無しでも十分量の NGS ライブラリーの増幅を実現したキットです。Hands-on time(分注操作数)の削減により、スループットが飛躍的に向上しております。事前に断片化したサンプルから 2 時間以内での NGS ライブラリー調製が可能です。

2. サンプル取り違いリスクの低減

末端平滑化～ライブラリー増幅までを 1 チューブで実現しました。サンプル取り違いリスク、および実験記録の手間を低減可能です。

3. 視認、および操作が容易な溶液添加量

反応溶液を視認し易く、取り扱いしやすい実験操作を実現しました。小数点以下の微量分注が不要(最少溶液添加量 3 μ L)です。

4. 自動化しやすい親切設計

最少溶液添加量が 3 μ L となっており、自動分注機等を用いたライブラリー調製の自動化がしやすい設計となっております。ライブラリー調製における自動分注機の占有時間、およびピペットチップ等のプラスチック消耗品を削減可能です(図 3)。

5. 高 GC 含有領域における高いカバレッジ

本キットは、ライブラリー増幅に高い正確性・増幅効率をもつ改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)を用い、試薬組成を最適化しております。本キットでは GC 含有率の高い領域でも高いカバレッジを実現しております。

6. その他

- ・PCR free のワークフローも可能

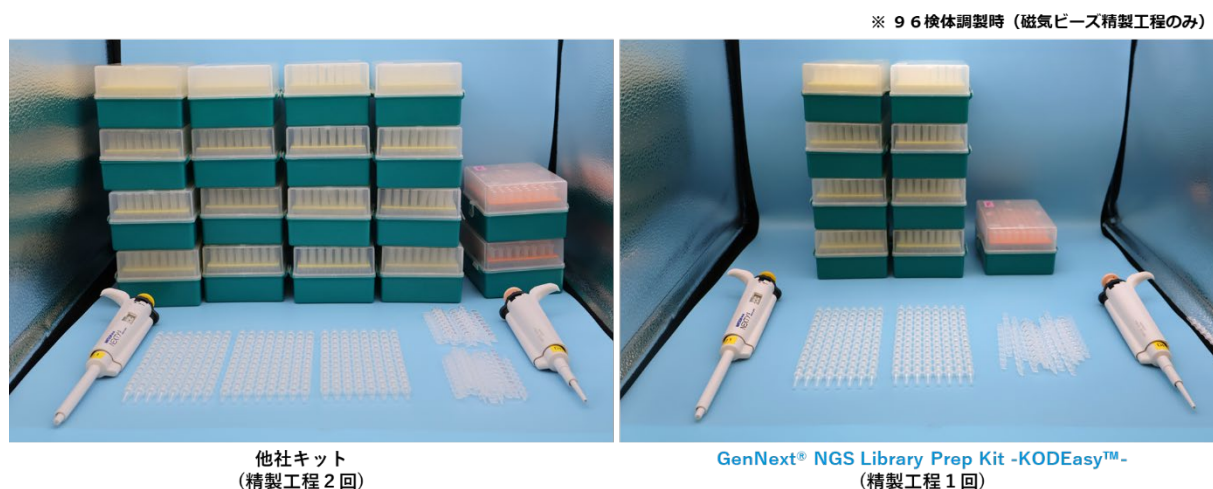


図 3. ライブラリー調製に必要なプラスチック消耗品例

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

GenNext® NGS Library Prep Kit –KODEasy™– (Code No. LPK-201,LPK-201T,LPK-201L)

パーツ名	保存	チューブ色	LPK-201 (24 回用)	LPK-201T (8 回用)	LPK-201L (96 回用)
KOD Blunting Solution (KB Solution)	-20℃	赤色	168 µL	56 µL	672 µL
Phosphorylating & A- Tailing Solution (PAT Solution)	-20℃	紺	72 µL	24 µL	288 µL
Ligation Solution	-20℃	黄緑	360 µL	120 µL	720 µL × 2 本
Library Amplification Solution	-20℃	紫	480 µL	160 µL	960 µL × 2 本
Library Amplification Primer Mix	-20℃	グレー	120 µL	40 µL	480 µL

各試薬の特徴(粘性)

パーツ名	粘性	溶液の特徴
KOD Blunting Solution (KB Solution)	低	高耐熱性・高正確性・増幅効率をもつ改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)を含んだ末端平滑化用反応溶液です。蓋を開ける前にタッピングや転倒混和等で混和した後、スピンドウンして、液を底に落としてからご使用ください。本溶液中に白色沈殿が見受けられる場合があります。この沈殿は安定化剤として使用しているアルブミンが沈殿を形成したものです。性能には問題ございませんので加熱して溶かしたりせず、よく溶液を混和しそのまま使用してください。
Phosphorylating & A- Tailing Solution (PAT Solution)	高	UKOD の Polymerase 活性と 3'→5' Exonuclease 活性を高効率的に抑える 2 種類のモノクローナル抗体、リン酸化酵素、A 付加酵素等を含み本キットに最適化された反応溶液です。失活のリスクを低減するため、取り扱いには氷上で、また激しい Vortex はしないでください。蓋を開ける前にタッピングや転倒混和等で混和した後、スピンドウンして、液を底に落としてからご使用ください。また粘性がありますので、ゆっくりとピペッティングを行ってください。
Ligation Solution	高	本キットに最適化された Ligation 用反応溶液です。2 本鎖 DNA に対する Ligation 酵素が含まれています。失活のリスクを低減するため、取り扱いには氷上で、また激しい Vortex はしないでください。蓋を開ける前にタッピングや転倒混和等で混和した後、スピンドウンして、液を底に落としてからご使用ください。また、粘性がありますので、ゆっくりとピペッティングを行ってください。
Library Amplification Solution	低	高正確性・増幅効率をもつ改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)を含み本キットに最適化されたライブラリー増幅用反応溶液です。Polymerase 活性と 3'→5' Exonuclease 活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体が混合されており、特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。蓋を開ける前にタッピングや転倒混和等で混和した後、スピンドウンして、液を底に落としてからご使用ください。通常の PCR 実験への使用は推奨しません。
Library Amplification Primer Mix	低	本キットに最適化されたライブラリー増幅用 Primer Mix です。P5、P7 フローセル配列を持つ illumina® シークエンサー用のライブラリーを効率的に増幅できるように配列設計されています。蓋を開ける前にタッピングや転倒混和等で混和した後、スピンドウンして、液を底に落としてからご使用ください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品のほかに、以下の機器・試薬類をご用意ください。

- ・ サーマルサイクラー
本製品の反応で使用する温度(4℃～98℃)を保つことができる機器をご用意ください。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。
- ・ 断片化装置または試薬
GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™-は、NGS ライブラリー調製用に一般的に使用される物理的断片化および酵素的断片化方法と互換性があります。お使いの断片化装置や断片化試薬の製造元の試薬の取扱説明書に従ってください。
- ・ アダプター
インデックスを有する Illumina[®] TruSeq™ などのライブラリー作製で一般的に使用されるアダプターが使用できます。

例: IDT[®] for Illumina[®] - TruSeq™ DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)
カタログ番号: 20040870

(上記以外も、同様の設計を有するアダプターであれば本キットで使用できます。)

- ・ SPRI(Solid phase paramagnetic bead) 磁性ビーズ
Agencourt[®] AMPure[®] XP 試薬(Beckman Coulter、カタログ番号: A63880、A63881 等)、Sera-Mag Select(GE Healthcare、カタログ番号: 29343045、29343052 等)を推奨いたします。ご使用にあたっては試薬の取扱説明書に従ってください。
※プロトコルでは Agencourt[®] AMPure[®] XP 試薬を用いた操作をお示ししております。
- ・ 10mM Tris-HCl(pH8.0-8.5)
アダプターストックの希釈および DNA の溶出に使用します。水での代用はできません。
- ・ 0.1×TE
DNA の溶出に使用します。
水での代用はできません(※ 10mM Tris-HCl(pH8.0-8.5)で代用可)。
- ・ 磁気スタンド(マグネットスタンド)
磁性ビーズを用いた精製時に使用します。
- ・ 80%エタノール
磁性ビーズを用いた精製時の洗い液として使用します。
(※ 用時調製した物をご使用ください。長期保管するとエタノール濃度が低下し、ライブラリー収量が低下します。)

[4] 重要：実験のコツ(Tips)

NGSライブラリー調製を安定的に実施する際のコツ(Tips)

重要(アダプターライゲーションに関して)

- (1) 試薬使用前には転倒混和などで均一化してから添加してください。
- (2) 試薬溶液、および反応溶液は氷上(またはアイスブロックやペルチェ素子上)などで十分冷却した上で添加混合してください。温度が高いまま混合すると、非特異的な産物が生じやすくなります。
- (3) アダプター溶液の添加後、しっかり混合してから、次のLigation Solution添加に進んでください。アダプター及び標的DNAの濃度が局所的に高い領域が存在していると(混合が不十分だと)、意図しないライゲーション反応が進みアダプターダイマーやキメラ核酸が生じやすくなります。
- (4) 激しいvortexはしないでください。酵素活性の低下につながる場合があります。

[5] 使用方法

図4の選択チャートに従い、調製プロトコルを選んで実施してください(図4)。

溶液混和方法

効率的なライブラリー調製を実施する為に、溶液の混和(均一化)には以下の方法をお勧めします。

・ピペッティングにより混合する場合

溶液量の約 8 割にダイヤルを設定し、ピペッティング(5~10 回程度)

(例: 総溶液量 32 μ L(サンプル 25 μ L+試薬 7 μ L)の場合、25.6 μ L にダイヤルを設定)

・プレートボルテックスを使用する場合

ピペッティングに加え、作業負荷の軽減やヒト間差低減のため、プレートボルテックスの採用をお勧めします。

MPS-1, High-Speed Multi Plate Shaker-Vortex (BIOSAN, BS-010216-A17)

反応溶液混合時: 2500 rpm, 30 sec

ビーズ精製時: 3200 rpm, 1 min

(※ビーズ凝集が強い場合があるため、溶液混合時よりも強めを推奨しております。)

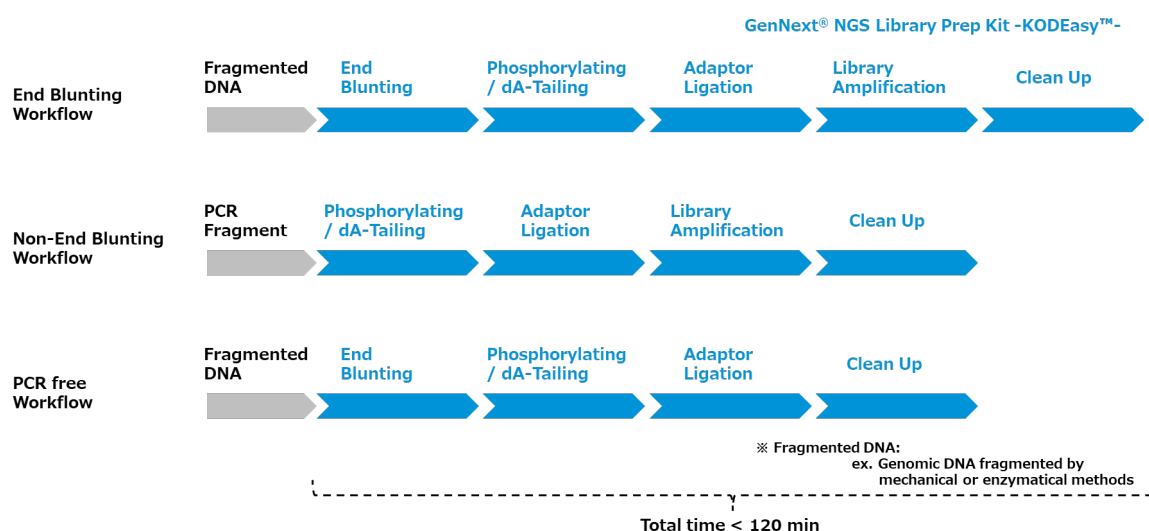


図 1. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- workflow (再掲)

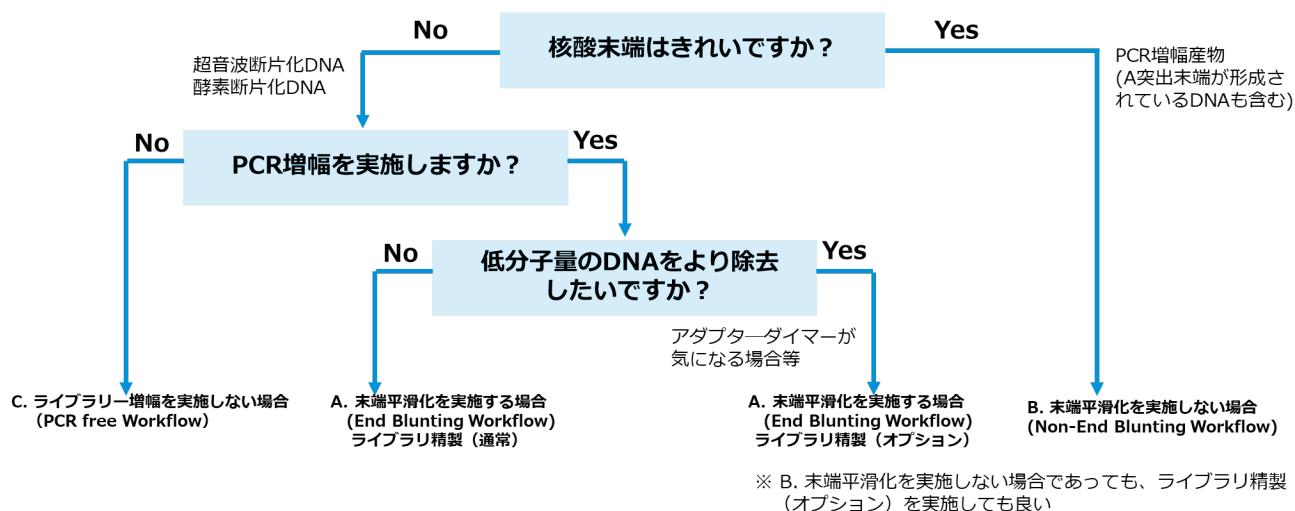


図 4. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-プロトコル選択チャート

ライブラリー調製前の事前準備

1. アダプター溶液の調製

アダプター(本製品には含まれません)を以下に示す推奨アダプター濃度を参考に、10 mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)を用いて希釈し、アダプター溶液を調製してください。

インプット量 (参考)	アダプター溶液濃度	アダプター:インサートのモル比
50 ~ 500 ng	15 µM	(200~20):1
25 ng	7.5 µM	200:1
10 ng	3 µM	200:1

※IDT® for Illumina® – TruSeq™ DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)(Cat No.20040870)の場合は、アダプター原液が 15 µM の場合に相当するとし、希釈をお願いします。

2. PCR サイクル数の決定

ライブラリー増幅における PCR サイクル数を以下に示すインプット DNA 量を参考に、設定してください。

推奨サイクル数

インプット量	サイクル数*
500 ng	0
200 ng	0-2
100 ng	0-2
50 ng	3-5
25 ng	5-6
10 ng	7-9

* サンプル種、鋳型のサイズ分布によって、最適なサイクル数は 1~3 サイクル前後する場合があります。

3. 80 %エタノールの調製

使用日当日中に調製してください。

A. 末端平滑化を実施する場合 (End Blunting Workflow)

(超音波断片化法、または酵素断片化法により断片化され、末端が歪な DNA の場合)



図 5. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- End Blunting ワークフローチャート

1. 末端平滑化

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
断片化 DNA 溶液	25 μ L
KOD Blunting Solution [※]	7 μ L
総溶液量	32 μ L

※ 本溶液中に白色沈殿が見受けられる場合があります。この沈殿は安定化剤として使用しているアルブミンが沈殿を形成したものです。性能には問題ございませんので加温して溶かしたりせず、よく溶液を混和しそのまま使用してください。

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
68°C	10 min
4°C	∞

2. リン酸化 & A 付加反応(抗体反応)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(末端平滑化済み)	32 μ L
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 μ L
総溶液量	35 μ L

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	∞

(次ページに続く)

3. アダプターライゲーション(※最重要工程)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(リン酸化/A 付加済み)	35 µL
アダプター溶液	5 µL
総溶液量	40 µL

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(3) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(アダプター溶液添加済み)	40 µL
Ligation Solution	15 µL
総溶液量	55 µL

(4) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(5) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
20°C	15 min
4°C	∞

※できるだけ速やかに次工程(4.ライブラリー増幅反応)に進む

4. ライブラリー増幅反応

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライゲーション後)	55 µL
Library Amplification Solution	20 µL
Library Amplification Primer Mix	5 µL
総溶液量	80 µL

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定で PCR 反応を実施する。

反応温度	反応時間
94°C	2 min
98°C	10 sec
60°C	15 sec
66°C	45 sec
4°C	∞

推奨サイクル数
を参照ください
p.8

(次ページに続く)

5-1. ライブラリー精製(通常)

※ 精製に関しては 5-1, 5-2 のどちらかを選択して実施する。低分子量の DNA をより除去したい場合は 5-2 を選択

(1) 以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライブラリー増幅後)	80 μ L
SPRI ビーズ(AMPure XP)	52 μ L
総溶液量	132 μ L

(2) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(3) 室温で 5 分間静置する。

(4) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(5) ビーズを吸引しないように、上清を除去する。

(6) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(7) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を除去する。

(8) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(9) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を完全に除去する。

(10) チューブの蓋を開け、3~5 分間風乾する(※乾燥させ過ぎない)。

(11) マグネットスタンドから外し、33 μ L の 0.1 $\times$ TE を添加する。

(12) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(13) 室温で 2 分間静置する。

(14) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(15) 上清 30 μ L をビーズを吸引しないように、新しい 8 連チューブに移す。

(16) 得られたライブラリーは -20°C で冷凍保管する(1ヶ月程度)。

(ライブラリー調製操作完了)

5-2. ライブラリー精製(オプション)

(1) 以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライブラリー増幅後)	80 μ L
SPRI ビーズ(AMPure XP)	52 μ L
総溶液量	132 μ L

(2) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(3) 室温で 5 分間静置する。

(4) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(5) ビーズを吸引しないように、上清を除去する。

(6) マグネットスタンドから外し、50 μ L の 0.1 $\times$ TE を添加する。

(7) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(8) 室温で 5 分間静置する。

(9) SPRI ビーズ(AMPure XP)を 40 μ L 添加する。

(10) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(11) 室温で 5 分間静置する。

(12) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(13) ビーズを吸引しないように、上清を除去する。

(14) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(15) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を除去する。

(16) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(17) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を完全に除去する。

(18) チューブの蓋を開け、3~5 分間風乾する(※乾燥させ過ぎない)。

(19) マグネットスタンドから外し、33 μ L の 0.1 $\times$ TE を添加する。

(20) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(21) 室温で 2 分間静置する。

(22) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(23) 上清 30 μ L をビーズを吸引しないように、新しい 8 連チューブに移す。

(24) 得られたライブラリーは-20℃で冷凍保管する(1ヶ月程度)。

(ライブラリー調製操作完了)

B. 末端平滑化を実施しない場合 (Non-End Blunting Workflow)

(PCR 産物等 (※末端アデニル化 PCR 産物はこちら))



図 6. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- Non-End Blunting ワークフローチャート

1. リン酸化 & A 付加反応(抗体反応)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
PCR 産物	25 μ L
KOD Blunting Solution※	7 μ L
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 μ L
総溶液量	35 μ L

※本溶液中に白色沈殿が見受けられる場合があります。この沈殿は安定化剤として使用しているアルブミンが沈殿を形成したものです。性能には問題ございませんので加温して溶かしたりせず、よく溶液を混和しそのまま使用してください。

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	∞

(次ページに続く)

2. アダプターライゲーション(※最重要工程)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(リン酸化/A 付加済み)	35 µL
アダプター溶液	5 µL
総溶液量	40 µL

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(3) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(アダプター添加後)	40 µL
Ligation Solution	15 µL
総溶液量	55 µL

(4) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(5) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
20°C	15 min
4°C	∞

※できるだけ速やかに次工程(3.ライブラリー増幅反応)に進む

3. ライブラリー増幅反応

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライゲーション後)	55 µL
Library Amplification Solution	20 µL
Library Amplification Primer Mix	5 µL
総溶液量	80 µL

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定で PCR 反応を実施する。

反応温度	反応時間
94°C	2 min
98°C	10 sec
60°C	15 sec
66°C	45 sec
4°C	∞

推奨サイクル数
を参照ください
p.8

(次ページに続く)

4. ライブラリー精製

(1) 以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライブラリー増幅後)	80 μ L
SPRI ビーズ(AMPure XP)	52 μ L
総溶液量	132 μ L

(2) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(3) 室温で 5 分間静置する。

(4) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(5) ビーズを吸引しないように、上清を除去する。

(6) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(7) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を除去する。

(8) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(9) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を完全に除去する。

(10) チューブの蓋を開け、3~5 分間風乾する(※乾燥させ過ぎない)。

(11) マグネットスタンドから外し、33 μ L の 0.1 $\times$ TE を添加する。

(12) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(13) 室温で 2 分間静置する。

(14) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(15) 上清 30 μ L をビーズを吸引しないように、新しい 8 連チューブに移す。

(16) 得られたライブラリーは -20°C で冷凍保管する(1ヶ月程度)。

(ライブラリー調製操作完了)

C. ライブラリー増幅を実施しない場合 (PCR free Workflow)

(超音波断片化法、または酵素断片化法により断片化され、末端が歪な DNA の場合)



図 7. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- PCR free ワークフローチャート

1. 末端平滑化

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
断片化 DNA 溶液	25 μ L
KOD Blunting Solution※	7 μ L
総溶液量	32 μ L

※本溶液中に白色沈殿が見受けられる場合があります。この沈殿は安定化剤として使用しているアルブミンが沈殿を形成したものです。性能には問題ございませんので加温して溶かしたりせず、よく溶液を混和しそのまま使用してください。

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
68°C	10 min
4°C	∞

2. リン酸化 & A 付加反応(抗体反応)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(末端平滑化済み)	32 μ L
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 μ L
総溶液量	35 μ L

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)。

(3) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	∞

(次ページに続く)

3. アダプターライゲーション(※最重要工程)

(1) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(リン酸化/A 付加済み)	35 μ L
アダプター溶液	5 μ L
総溶液量	40 μ L

(2) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(3) 氷冷しながら、以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(アダプター添加後)	40 μ L
Ligation Solution	15 μ L
総溶液量	55 μ L

(4) 反応液を均一にする(ピペッティングや軽い Vortex 等)

(5) 以下の設定でインキュベートする。

反応温度	反応時間
20°C	15 min
4°C	∞

(次ページに続く)

4. ライブラリー精製

(1) 以下のように試薬溶液を上から順に添加する。

試薬	添加量
反応溶液(ライゲーション後)	55 μ L
SPRI ビーズ(AMPure XP)	36 μ L
総溶液量	91 μ L

(2) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(3) 室温で 5 分間静置する。

(4) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(5) ビーズを吸引しないように、上清を除去する。

(6) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(7) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を除去する。

(8) 80% エタノールを 200 μ L 添加し、30 秒静置する。

※ビーズを懸濁させない。

(9) ビーズを吸引しないように、上清(80% エタノール)を完全に除去する。

(10) チューブの蓋を開け、3~5 分間風乾する(※乾燥させ過ぎない)。

(11) マグネットスタンドから外し、33 μ L の 0.1 $\times$ TE を添加する。

(12) ピペッティングまたは Vortex などにより良く懸濁させる。

(13) 室温で 2 分間静置する。

(14) マグネットスタンドにセットして、溶液が透明になるまで室温で静置する。

(15) 上清 30 μ L をビーズを吸引しないように、新しい 8 連チューブに移す。

(16) 得られたライブラリーは-20℃で冷凍保管する(1ヶ月程度)。

(ライブラリー調製操作完了)

ライブラリーの検証

本製品を用いて調製されたライブラリーのサイズ分布確認には、4200 TapeStation System (Agilent Technologies) や Bioanalyzer (Agilent Technologies)、MultiNA[®] (島津製作所) 等の電気泳動で確認することをお勧めします。ライブラリー定量を qPCR で実施する場合は、GenNext[®] NGS Library Quantification Kit (Code: NLQ-101)、あるいは同等の市販品を用いることを推奨します。GenNext[®] NGS Library Quantification Kit (Code: NLQ-101) は 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。

[6] 実施例

1. ライブラリー収量および分布の比較

GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™を用いた NGS ライブラリー調製の実施例を以下に示します。ライブラリーのクリーンアップは Agencourt® AMPure® XP 試薬(Beckman Coulter)を用いて実施しました。NGS ライブラリー(アダプターダイマー)の分布、および収量は 4200 TapeStation System (Agilent Technologies) で確認しました。ライブラリー濃度は 180~1000 bp、アダプターダイマー濃度は (120~160bp)のシグナルをスミア解析により算出しました。

実施例 1-1.

<方法>

超音波断片化処理済み(平均鎖長 200 bp)のヒトゲノム DNA、Thermus thermophilus HB8 (Tth)ゲノム DNA 10 ng から、GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™あるいは A 社ライブラリー、および B 社ライブラリー調製キットでライブラリーを調製しました。PCR サイクル数は 8 サイクルで増幅しました。

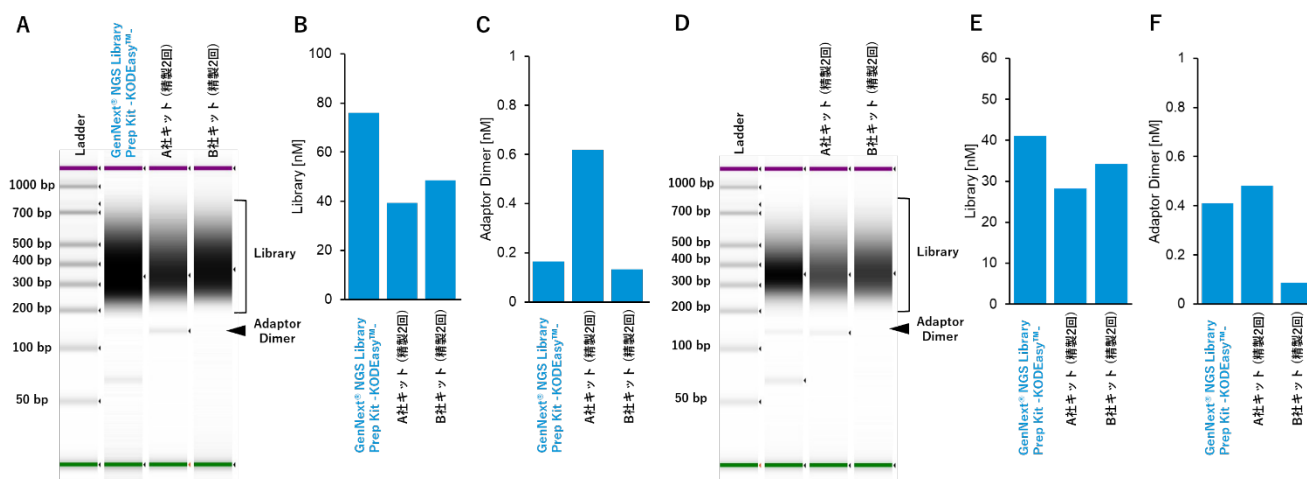


図 8. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™は様々な生物種からのライブラリー調製が可能

結果として、ヒトゲノム DNA(図 8-A、B、C)、および Tth ゲノム DNA(高 GC 含有率)(図 8-D、E、F)をインプット DNA として用いた場合であっても、ライブラリーサイズ分布(図 8-A、D)は他社競合品(精製 2 回)と比較して同等、ライブラリー収量(図 8-B、E)は同等以上、アダプターダイマー濃度(図 8-C、F)も同等でした。いずれも、Illumina シークエンサーに供するために必要な 4 nM 以上の収量が得られました。

実施例 1-2.

<方法>

超音波断片化処理済み(平均鎖長 300 bp、および約 500 bp)のヒトゲノム DNA 10 ng から、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-でライブラリーを調製しました。PCR サイクル数は 8 サイクルで増幅しました。ライブラリーのサイズ分布(図 9-A)、ライブラリー収量(図 9-B)、およびアダプターダイマー量(図 9-C)を評価しました。

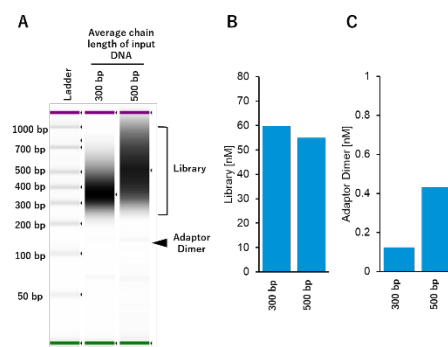


図 9. GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-は様々なサイズ範囲の DNA からのライブラリー調製が可能

結果として、異なるサイズのゲノム DNA をインプット DNA として用いた場合であっても、いずれも、Illumina シークエンサーに供するために必要な 4 nM 以上の収量が得られました。

実施例 1-3.

<方法>

超音波断片化処理済み(平均鎖長 約 200 bp) のヒトゲノム DNA 10 ng、100 ng、および 200 ng から、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-を用いてライブラリーを調製しました。PCR サイクル数は 5 サイクルで増幅しました。ライブラリーのサイズ分布(図 10-A)、ライブラリー収量(図 10-B)、およびアダプターダイマー量(図 10-C)、およびエレクトログラム(図 10-D)を評価しました。

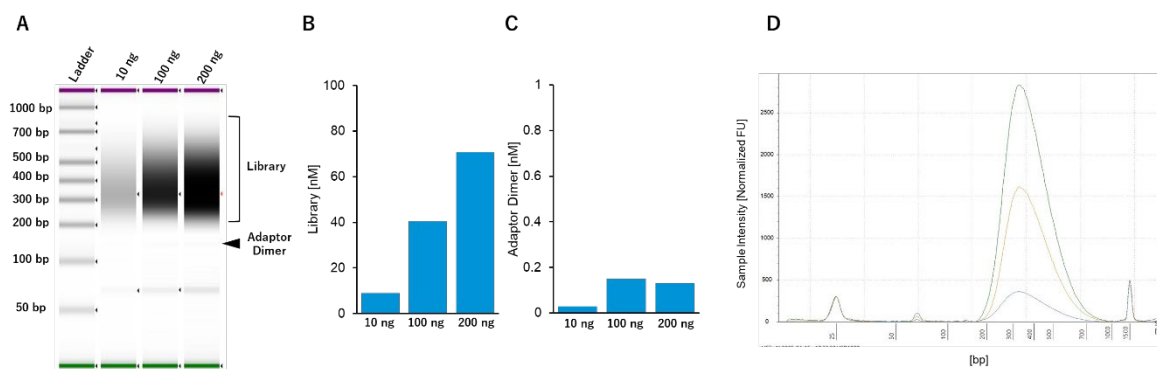


図 10. GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-は様々なインプット量の DNA からのライブラリー調製が可能

結果として、異なるインプット量のゲノム DNA からでも、いずれも、Illumina シークエンサーに供するために必要な 4 nM 以上の収量が得られました。

実施例 1-4.(オプションプロトコルの実施例)

<方法>

超音波断片化処理済み(平均鎖長 約 200 bp)のヒトゲノム DNA 10 ng から、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[™]-でライブラリーを調製しました。NGS 前の精製工程を通常プロトコル(Normal)、お

よびオプションプロトコル(Option)で各 n=2 で実施しました。PCR サイクル数は 8 サイクルで増幅しました。ライブラリーのサイズ分布(図 11-A)、ライブラリー収量(図 11-B)、およびアダプターダイマー量(図 11-C)を評価しました。

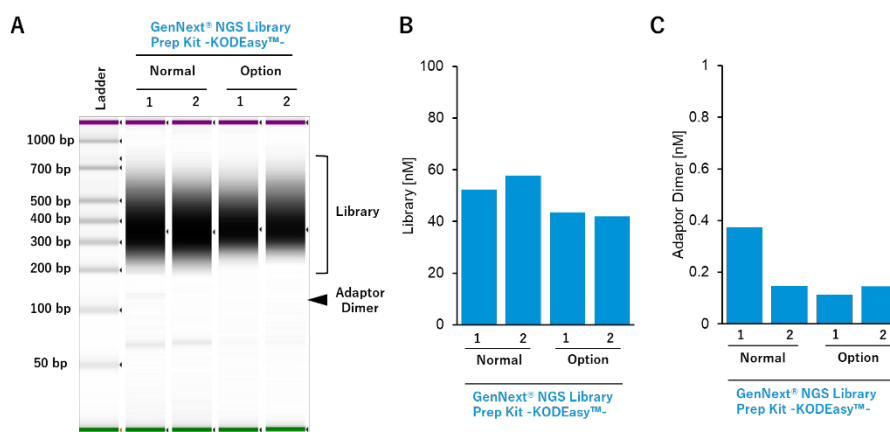


図 11. 精製プロトコル(オプション)を用いた際のライブラリーサイズ分布、ライブラリー収量、およびアダプターダイマー量

結果として、オプションプロトコルを用いて、NGS 前の精製を実施した場合、短鎖長側 DNA 分布が抑制されていました。

2. NGS 解析結果の評価

GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™-を用いて調製された NGS ライブラリーの解析を MiSeq™ (illumina[®] 社) および MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) (illumina[®] 社) を用いて実施しました。リード数を揃えるため sektk v1.4 を用いて各サンプル 50 万リードにダウンサンプリングを行った後、cutadapt v3.5 を用いて、アダプタトリムを実施しました。マッピングは bowtie2 v2.5.2 を用いてリファレンスゲノムにアラインし解析を実施しました。

実施例 2-1

<方法>

超音波断片化ヒトゲノム DNA (10ng, サイクル数: 8) の条件で解析を実施しました。ライブラリーの調製は、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™- あるいは A 社ライブラリー調製キット、および B 社ライブラリー調製キットを用いて実施しました。ヒトゲノム DNA (GRCh38) をリファレンスゲノムとして、マッピングを実施しました。マッピングされたリードの百分率(% of Mapped Reads) は、50 万リード中のリファレンスにマッピングされたリードを算出しました(図 12-A)。インサートサイズは Picard (CollectInsertSizeMetrics) を用いて算出しました(図 12-B)。

上記に加えて、混合微生物ゲノム DNA (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard II (Log Distribution), ザイモリサーチ社) より、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™- を用いて、次世代シーケンサー解析を実施しました(サイクル数: 8)。リファレンスゲノムとして、複合リファレンスゲノムを作成し、マッピングを実施しました。マッピング後のデータより、生物種毎にマッピングされたリード数をカウントしました。その後、理論的な組成、および検出された組成間の相関性を評価しました(図 12-C)。

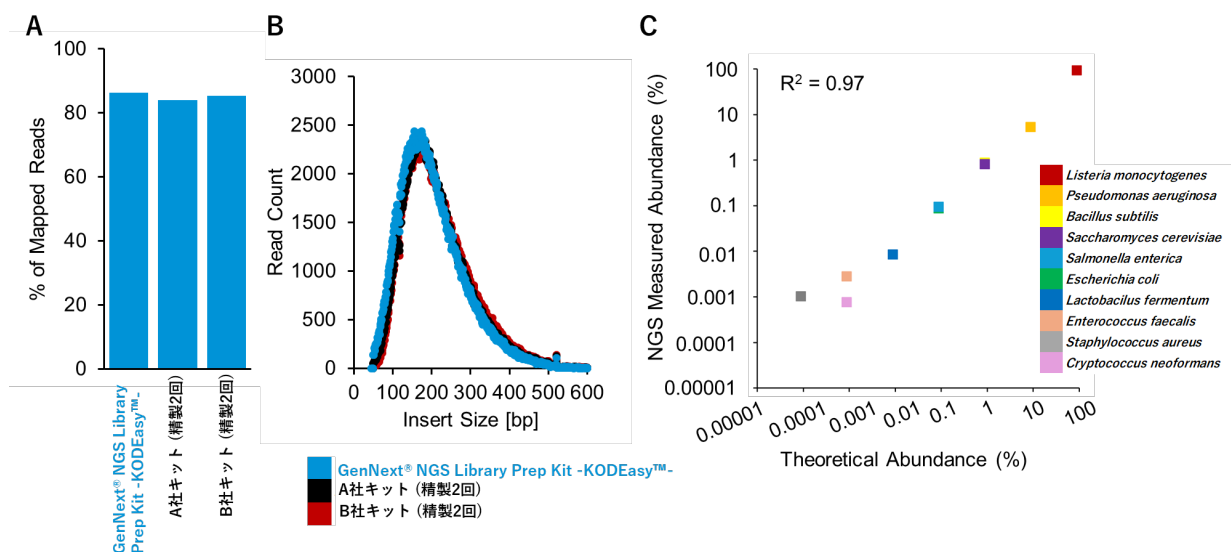


図 12. GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™-で調製された NGS ライブラリーの解析結果

結果として、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™-はマッピング率、およびインサートサイズ共に、他社品(精製 2 回)と同程度でした。また、混合微生物ゲノム DNA に対して、検出された組成が理論値と高い相関性を示しました(決定係数(R^2) = 0.97)。

実施例 2-2

<方法>

高 GC 含有率で知られる *Thermus thermophilus* HB8 (Tth) ゲノム DNA に対し、GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy™-の高 GC 含有領域に対するライブラリー調製能を評価しました。超音波断片化処

理済み(平均鎖長 200 bp) Tth ゲノム DNA 10 ng より、サイクル数: 8 の条件で解析を実施しました。Tth ゲノム DNA をリファレンスゲノムとして、マッピングを実施しました。GC 含有率に対する相対的なカバーレッジは Picard(CollectGcBiasMetrics)を用いて算出しました(図 13)。

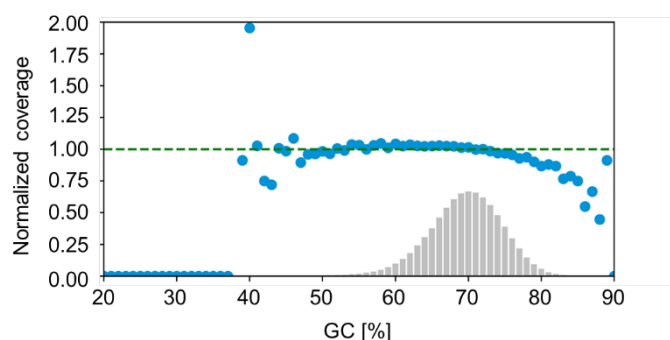


図 13. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-は高 GC 含有 DNA から NGS 解析が可能

結果として、GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-は GC 含有率 70%以上の領域に対しても、高い検出率を示しました(青丸: Normalized coverage; 灰色ヒストグラム: リファレンスゲノムの 100 bp ウィンドウにおける GC 含量の分布を示すヒストグラム; 緑点線: リファレンスゲノムより期待される検出リード数により規格化された検出リード数の相対値)。

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
ライブラリーの収量が低い	DNA の純度が低い	DNA 調製時に残留した不純物によって反応が阻害されている可能性があります。鋳型 DNA を再精製してください。
	DNA が分解	凍結融解や、DNase、その他分解酵素の意図しない混入や、過剰な断片化によって DNA が分解している可能性があります。断片化 DNA の再調製を行ってください。また、断片化 DNA を低濃度で保存した場合、DNase による分解を受けやすくなるほか、反応容器への吸着によって実質的な DNA 量が減少する場合があります。希釈した DNA は、使用後に凍結保存して再使用することは避け、毎使用時に高濃度保存液から調製することをお勧めします。
	DNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、およそ 10～500 ng までの断片化 DNA (25 μ L 反応系)を用いた場合に安定的なライブラリー調製可能であることを確認していますが、DNA の種類や品質によっては、反応可能な DNA の量は変動する可能性があります。鋳型 DNA の添加量を増減させてください。
	溶液混合が不十分	本製品では、粘性の高い試薬溶液を使用します。そのため、溶液混合が不十分であった場合、反応が進行しません。本説明書に記載の方法により、確実に溶液混合を実施することを推奨します。
	アダプター核酸の劣化	本製品では、TA ライゲーションを活用したライブラリー調製を実施します。アダプターの凍結融解等によるアダプター末端の分解は、標的 DNA に対するライゲーション効率を低下させます。アダプター溶液の再調製(交換)を実施してください。
	80 %エタノールの劣化	80 %エタノールが劣化した場合、Wash 時に Loss するライブラリー量が増加した結果、収量が低下します。80 %エタノールは当日調製してください。
	DNA 溶出前に 80 %エタノールが残留している。	風乾後のチューブに 80 %エタノールが残留している量が多い場合(例 目視でチューブ内に溶液が確認される)、ライブラリーの溶出量が低下します。風乾前に、低用量のピペットマン等を用いて、80 %エタノールの除去をできる限り実施してください。
	DNA 溶出前にビーズを乾燥させ過ぎている。	ライブラリー溶出前の磁気ビーズを乾燥させ過ぎた場合、ライブラリーの溶出量が低下します。風乾させ過ぎないようにして下さい。

アダプターダイマーの比率が高い	DNA が分解	凍結融解や、DNase、その他分解酵素の意図しない混入や、過剰な断片化によって DNA が分解している可能性があります。断片化 DNA の再調製を行ってください。DNA 溶液中に 4 ～ 5 bp 程度の鎖長の DNA の存在比率が上昇した場合、見かけ上のアダプターダイマー比率が上昇する可能性があります。ライブラリー調製前に磁気ビーズや電気泳動等によるサイズセレクションにより、短鎖 DNA の比率を低下させてください。
	DNA の量が少なすぎる。	本製品では、およそ 10～500 ng までの断片化 DNA (25 μ L 反応系)を用いた場合に安定的なライブラリー調製可能であることを確認していますが、DNA の種類や品質(鎖長)によっては、反応可能な DNA の量は変動する可能性があります。鋳型 DNA の添加量を増加させてください。
	ライゲーション時の溶液混合(アダプター添加後、Ligation Solution 添加前)が不十分	ライゲーション反応前、アダプター添加時の混合が不十分である可能性があります。本製品では、当社技術によりアダプターダイマー生成反応を低減させています。しかしながら、高濃度のアダプター分子が存在する領域においては、アダプター分子同士が結合する確率が上昇し、アダプターダイマー比率が上昇する可能性があります。Ligation Solution 添加前、アダプター溶液添加後の混合を確実に実施してください。また上記非特異反応を抑制するのに、反応溶液、およびアダプター溶液の氷冷が有効です。
	ライゲーション時の溶液混合(Ligation Solution) 添加後)が不十分	Ligation Solution 添加後の混合が不十分である可能性があります。本製品では、当社技術によりアダプターダイマー生成反応を低減させています。しかしながら、高濃度の試薬溶液成分は、アダプター分子同士が結合する確率を上昇させ、アダプターダイマー比率が上昇させる可能性があります。適切な成分濃度での反応実施のため Ligation Solution 添加後の混合を確実に実施してください。また上記非特異反応を抑制するのに、反応溶液、およびアダプター溶液の氷冷が有効です。
	アダプター核酸の劣化	本製品では、TA ライゲーションを活用したライブラリー調製を実施します。アダプターの凍結融解等によるアダプター末端の分解はアダプター分子同士が結合する確率が上昇し、アダプターダイマー比率が上昇させる可能性があります。アダプター溶液の再調製(交換)を実施してください。

	SPRI ビーズの添加量が多い	本製品では、磁気ビーズを用いた精製を PCR 後に実施することにより、アダプターダイマーを含む短鎖 DNA を除去します。SPRI ビーズ溶液の添加量が多い場合、短鎖 DNA のビーズ表面への結合力が上昇し、アダプターダイマーを含む短鎖 DNA が増加します。メーカー推奨の方法による磁気ビーズによる再精製を実施してください。
--	-----------------	--

[8] 関連商品

PCR 試薬

品名	内容	Code No.
高速・高正確・高成功率 PCR Master Mix KOD One® PCR Master Mix	1 mL × 5 本 (200 回用 /50 µL 反応)	KMM-101
マルチプレックス PCR・バイサルファイト処理 DNA 用高 正確性 PCR 酵素 KOD -Multi & Epi-®	200 U × 1 本 (200 回用)	KME-101
高効率・高成功率 PCR Master Mix KOD FLEX™ PCR Master Mix	1 mL × 5 本 (200 回用 /50 µL 反応)	KMX-101

ライブラリー定量試薬 (PCR)

品名	内容	Code No.
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット GenNext® NGS Library Quantification Kit	(500回用/20µL 反応)	NLQ-101

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください
<https://lifescience.toyobo.co.jp/>



【製造・販売元】

－価格・在庫に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部（大阪）
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部（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（土日祝日、休日を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co>