



GenNext[®] Transposase-based DNA Library Prep Kit

[Code No. TNP-101, TNP-101L, TNP-101T]

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]	使用方法	7
	1. DNA からのライブラリー調製	7
	A. 断片化・タグメント化反応	7
	B. Additional 反応	8
	C. Gap Repair 反応	8
	D. ライブラリーエンリッチメント	8
	E. ライブラリーの精製	9
	2. ライブラリー検証	10
[5]	トラブルシューティング	11
[6]	関連製品	12
[7]	参考文献	12

—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・臨床用試薬としては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、製品 SDS をご参照いただき、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。

※RamDA-seq[®]、RT-RamDA[®]、Shin-RamDA-seq[®]は国立研究開発法人理化学研究所の登録商標です。

※GenNext[®]、KODEasy[®]、Fortissimo[™]は、東洋紡株式会社の研究用試薬を示す登録商標または商標です。

※その他の登録商標または商標は各所有者に帰属します。

[1] はじめに

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit は、微量の二本鎖 DNA から簡便かつ迅速に次世代シーケンス解析(NGS)用のライブラリー調製を行うためのキットです。

本キットでは、トランスポゼースによる断片化・タグメント化反応を利用しており、サンプルとなる DNA の事前の断片化が不要です。また独自のライブラリー調製法を採用することで、簡便性・迅速性と高効率を実現しています。

また本キットを RNA から二本鎖 DNA を調製するキットと組み合わせて使用することで、微量な RNA から NGS 用のライブラリーを調製することも可能です。

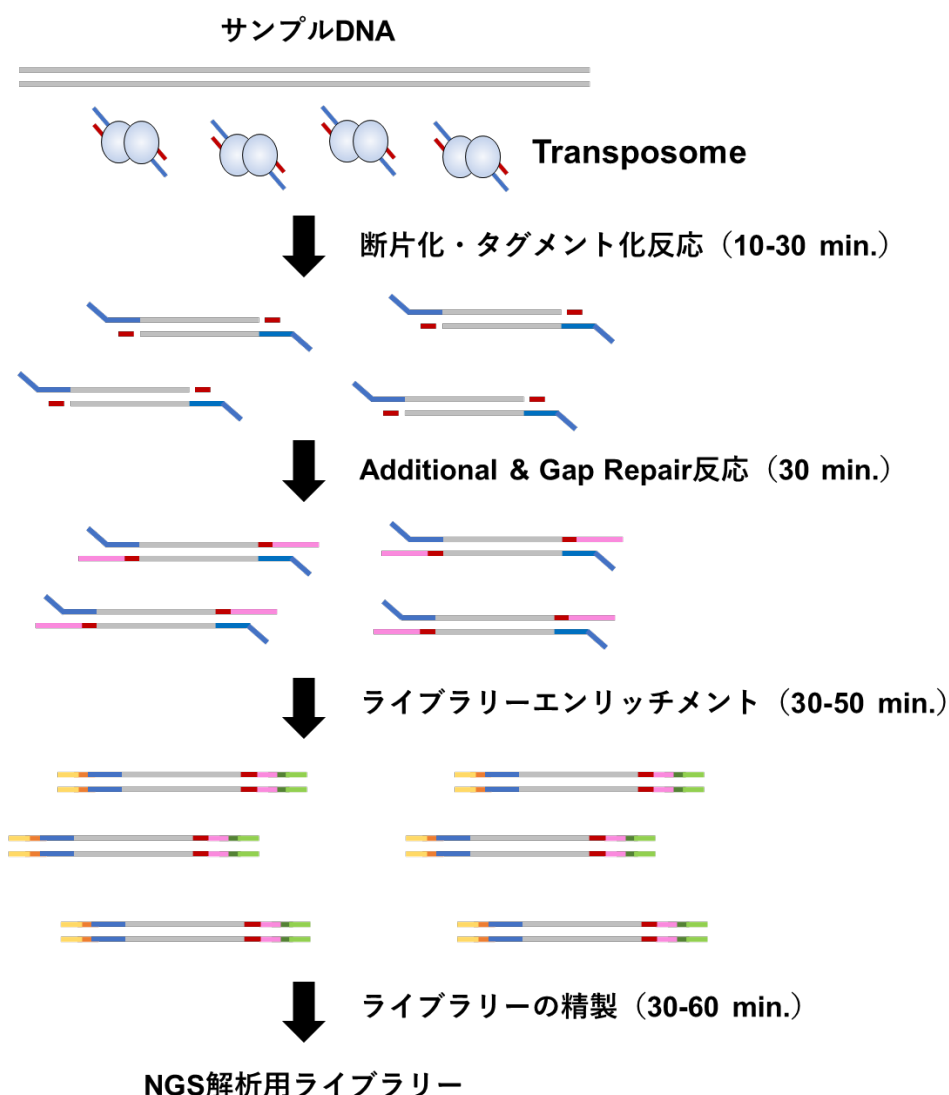


図 1. 本キットのワークフロー

各ステップの反応時間を示します。本キットには、ワークフロー中のライブラリーエンリッチメント、ライブラリーの精製に使用する、磁性ビーズ、インデックスプライマー試薬を含みます。「[3] 製品のほかに用意するもの」(p.4)を参照し、ご用意ください。

◆本キットの特長◆

1. 微量 DNA からライブラリー調製可能

サンプルとして、100 pg~10 ng DNA に対応可能です (1 ng を推奨しています)。

2. 断片化されていない DNA からライブラリー調製可能

トランスポゼースによる断片化・タグメント化反応を利用するため、断片化されていない DNA をサンプルとして使用可能です。

3. 簡便、迅速、高効率

独自のライブラリー調製法を採用しており、フロー途中での磁気ビーズ等による精製ステップが不要なため、ロスなく簡便にライブラリー調製が可能です (NGS 解析前の精製は必要です)。

4. RNA から二本鎖 DNA を調製するキットと組み合わせ可能

GenNext[®] RamDA-seq[®] Single Cell Kit [Code No. RMD-101, RMD-101T]、GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Single Cell Stranded Kit w/o LP [Code No. RML-111, RML-111T]、Fortissimo[™], GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Kit for Degraded RNA [Code No. RMF-111, RMF-111T]などの弊社キットと組み合わせることで、微量な RNA からライブラリー調製が可能です (詳細は各キットの取扱説明書をご参照ください)。

◆本キットを用いた全ゲノム解析について◆

本キットを用いて全ゲノム解析 (Whole Genome Sequence) を実施する場合、サンプルとしては微生物由来のゲノムなどの数 M bp 以下の DNA を使用することを推奨します。

ヒトなどの高等生物由来のゲノム全長をサンプルとする場合、一部の配列にシーケンスが集中し、結果として十分なシーケンスカバレッジが得られないことがあります。

[2] 製品内容

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit (TNP-101, TNP-101L, TNP-101T))には以下の試薬が含まれています。試薬は-20℃で保存してください。

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit (TNP-101, TNP-101L, TNP-101T)

試薬名	保存	容量		
		TNP-101T (12 回用*)	TNP-101 (48 回用*)	TNP-101L (96 回用*)
①Tagmentation Buffer	-20℃	37.5 µL	150 µL	300 µL
②Transposase for Tagmentation	-20℃	30 µL	120 µL	240 µL
③Additional Solution	-20℃	30 µL	120 µL	240 µL
④Gap Repair Buffer	-20℃	156 µL	624 µL	1248 µL
⑤Gap Repair Enzyme Mix	-20℃	54 µL	216 µL	432 µL
⑥KOD Master Mix	-20℃	120 µL	480 µL	960 µL

*本キットを GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [Code No. RMD-101, RMD-101T]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP [Code No. RML-111, RML-111T]、Fortissimo™, GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [Code No. RMF-111, RMF-111T]と組み合わせて使用する場合、1/2 倍スケールで使用するため、容量は 2 倍となります(12 回用→24 回用、48 回用→96 回用、96 回用→192 回用)。

—注意事項—

本製品には磁性ビーズ、NGS 用インデックスプライマーが付属しておりません。【[3] 製品のほかに用意するもの】で後述する精製ビーズ、NGS 用インデックスプライマーを別途ご用意ください。

本キットでは微量のサンプルからライブラリー調製を行うため、作業工程中で環境中の DNA などが混入すると、実験結果が著しく損なわれる可能性があります。清浄度の高い部屋で作業を行うなど、コンタミネーション対策には十分注意してください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本キットのほかに、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、またはインキュベーター
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。
- ・ 磁性ビーズ
Agencourt AMPure XP 試薬 (Beckman Coulter、カタログ番号 : A63880、A63881 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。
- ・ 磁気スタンド
磁性ビーズを用いた精製の際に使用します。
磁気スタンドにはマグネットプレート Bit-Mag96(サンブラテック 品番 : 30550) がお使いいただけます。
- ・ 80%エタノール
磁性ビーズを用いた精製の際の洗浄液として使用します。
- ・ TE Buffer (10mM Tris 1mM EDTA) pH8.0
ライブラリー調製時に DNA の溶出に使用します。10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液などでも代用可能です。
- ・ NGS 用インデックスプライマー
インデックスを有する Nextera XT Library Prep Kit (Illumina 株式会社) 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。

製品名 (例)	カタログ番号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001
	FC-131-2002
	FC-131-2003
	FC-131-2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654
	20091656
	20091658
	20091660

以下の消耗品は動作確認済みとなります。

チューブ及びキャップ	メーカー	カタログ番号
UC,EU Optical wide area 8-cap strip, Robust while flexible,with wide indented flat cap	Nippon genetics /BIOplastics	BPB79701-1 /BPB79701-1
RP,UC,SFGC,Extra Robust,Fits shell Frame Grids (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPK69901/ K69901

96 well プレート及びシール	メーカー	カタログ番号
RP,LF,SEMI k,cuttable,96 well plate (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPB50651/ B50651
EU Optical wide area 96 cap plate with wide area indented flat caps	Nippon genetics /BIOplastics	BPB57601/ B57601

マグネットスタンド	メーカー	カタログ番号
Magna Stand for 8-well tube preparation	Nippon genetics	FG-SSMAG2
Bit-Mag96	サン普拉テック	30550

[4] 使用方法

- 本取扱説明書は、ゲノムなどの DNA 溶液をサンプルとした場合の protocols を記載しています。GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [Code No. RMD-101, RMD-101T]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP (Code No. RML-111, RML-111T)、Fortissimo™, GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [Code No. RMF-111, RMF-111T]などの弊社キットと組み合わせる場合は、当該キットの取扱説明書をご参照ください。
- 全ステップにおいて、試薬の添加後はピペットやミキサー、タッピング等で十分に攪拌を行ってください。

【参考】

試藥添加→遠心→攪拌(ミキサ: 2000 rpm、4°C、1 min.)→遠心

試薬添加→攪拌(ピペッティング: 20 回 on ice)→遠心 など

1. DNA からのライブラリー調製

解析したい DNA 溶液から本製品を用いてライブラリー調製します。DNA 溶液が濃すぎるとうまく断片化されないことがあるため、あらかじめヌクレアーゼフリーの滅菌水などで 200 pg/μL 程度に希釈したものをを用いることを推奨します (20 pg/μL~2 ng/μL 程度までであればライブラリー調製は可能ですが、サンプルの状態によってはうまくライブラリーが得られないことがあります)。

- ・ 尚、TE Buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) による希釈も可能です。

A. トランスポゾンによる断片化・タグメント化反応

- (1) 200 pg/μL 程度の DNA 溶液 5 μL (1 ng 分)に対して①Tagmentation Buffer を 2.5 μL ずつ添加し、攪拌します。
- (2) ②Transposase for Tagmentation を 1 well あたり 2.5 μL 添加し、攪拌、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

タグメンテーション反応

Step	Temperature	Time
Tagmentation	45°C	10 min.*
	4°C	hold

*サンプル量が多い、少ない、または DNA が損傷しているなどの理由で十分なライブラリー収量が得られない場合、45℃のインキュベーション時間を 20 min. にすることで収量が改善する場合があります。

B. Additional 反応

- (1) タグメンテーションした DNA に対し、③Additional Solution を 1 well あたり 2.5 μ L 添加します。その後、遠心を行い、25°C、2000 rpm にて 1 分間攪拌し、5 分間静置してください。

C. Gap Repair 反応

- (1) ④Gap Repair Buffer を 13 μ L ずつ添加し、遠心します。
- (2) ⑤Gap Repair Enzyme Mix を 4.5 μ L ずつ添加し、攪拌、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

Gap Repair 反応

Step	Temperature	Time
Gap Repair	20°C	20 min.
Denature	75°C	10 min.
	4°C	hold

D. ライブラリーエンリッチメント

- (1) Gap Repair 反応後の溶液 30 μ L に対し、KOD Master Mix を 10 μ L 添加し、遠心します。その後、Nextera XT Library Prep Kit などで使用可能な Index primer F と Index primer R をそれぞれ 5 μ L ずつ (Nextera XT index Kit の場合)、または、プライマーミックスを 10 μ L (Illumina DNA/RNA UD Indexes の場合) 添加し、遠心します。

例えば、以下のインデックスプライマーキットは使用可能です。インデックスプライマーをご自身で用意される場合は 3 μ M 程度に調整して使用ください。

製品名 (例)	カタログ番号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001 FC-131-2002 FC-131-2003 FC-131-2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654 20091656 20091658 20091660

(2) 遠心後、以下のサイクルで PCR を行ってください。

ライブラリーエンリッチメント反応

Step	Temperature	Time	
Denature	94°C	2 min.	
PCR	98°C	10 sec.	12-14 cycles*
	60°C	30 sec.	
	68°C	30 sec.	
	4°C	hold	

下記記載の表を参考に PCR サイクルを変更してください。*

DNA 量	PCR サイクル数
10 ng-1 ng	12
1 ng 未満	13-14

*ライブラリー収量が多い場合、PCR サイクルを減らしていただくことも可能です。

*15 サイクル以上に増やすことも可能ですが、NGS 解析での結果に悪影響を及ぼす可能性があります。

E. ライブラリーの精製

(1) PCR 溶液 50 μ L に対して 1 \times AMPure XP beads を 30-50 μ L* 添加してください。その後、遠心を行い、25°C、2,000 rpm にて 2 分間攪拌し、5 分間静置してください。

* ゲノム DNA などの数十 kb 以上のサンプルからライブラリー調製する場合は 30 μ L、プラスミドや PCR アンプリコンなどの数 kb 以下のサンプルの場合は 40 μ L、それよりも短い DNA の場合は 50 μ L を目安として添加してください。

(2) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。その後、上清を除去します。

(3) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 150 μ L 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(4) エタノールを除去します。

(5) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 150 μ L 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(6) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。

(7) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、25°Cで 5 分間、ま

たは室温にて 5 分～10 分ドライアップします*。

* エタノールが残存していると反応がうまくいかない可能性があります。磁性ビーズがひび割れはじめるまでドライアップしてください。室温や湿度により、ドライアップの時間を調整してください。

(8) 96 well プレートまたは 8 連チューブに TE Buffer を 1 well あたり 40 μ L* 添加し、遠心します。

* ライブラリー濃度を高めたい場合は、20-30 μ L 程度で溶出することもできます。

(9) ビーズが完全に分散するまで Vortex を行い、25℃で 2 分間インキュベートを行い、遠心します。

(10) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで 2 分間静置します。

(11) 透明な上清 30 μ L を新しいチューブあるいはプレートに移し、QC のステップに進むか、-20℃にて保管してください。

2. ライブラリーの検証

(1) ライブラリーの定量

GenNext® NGS Library Quantification Kit [Code No. NLQ-101]、あるいは同等の市販品を用いて、qPCR で定量することを推奨いたします。GenNext® NGS Library Quantification Kit [Code No. NLQ-101] は Illumina 株式会社次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットで、Illumina 株式会社が採用している 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。

(2) ライブラリーサイズ分布の確認

ライブラリーの分布を確認する場合は、Bioanalyzer(アジレント・テクノロジー株式会社)、MultiNA(株式会社島津製作所)等の電気泳動で確認することをお勧め致します。

[5] トラブルシューティング

現象	原因	対策
得られるライブラリーの収量が少ない	サンプル DNA の鎖長が短い	<ul style="list-style-type: none"> ・トランスポゾンによるタグメント化反応の反応時間を 10 分から 20 分に長くすることで改善することがあります (ただしライブラリー鎖長はやや短くなります)。 ・ライブラリー精製時の磁性ビーズの添加量を 30μL から 50μL に増やすことで改善することがあります。
	DNA のインプット量が多すぎる/少なすぎる	<ul style="list-style-type: none"> ・DNA のインプット量が多すぎる、少なすぎると適切にタグメント化されず、ライブラリー収量が低下することがあります。1 ng 程度のインプット量を推奨しています。 ・DNA のインプットが少なすぎる場合でインプット量を増やすことができない場合、トランスポゾンによるタグメント化反応の反応時間を 10 分から 20 分に長くする、PCR サイクル数を増やすことで収量が改善することがあります。ただし PSR サイクルを増やすことで NGS 解析の結果が悪化することがあります。
結果が安定しない、日間差、サンプル間差が大きい	精製時のエタノールが残存している	<ul style="list-style-type: none"> ・磁性ビーズをエタノールで洗浄した際にエタノールが残存していると後反応を阻害することがあります。磁性ビーズが乾燥しているか確認してください。 ・作業部屋の湿度が高いとビーズの乾燥がされにくい場合があります。作業部屋の湿度を 55% 以下にすることを勧めします。

[6] 関連製品

品名	内容	Code No.
Illumina 株式会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
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー調製キット GenNext[®] NGS Library Prep Kit	24 回用	LPK-101
改良版 次世代シーケンサー用ライブラリー調製キット GenNext[®] NGS Library Prep Kit -KODEasy[®]-	24 回用	LPK-201
NGS 解析用 cDNA 調製キット GenNext[®] RamDA-seq[®] Single Cell Kit	96 回用	RMD-101
NGS 解析用 cDNA 調製キット GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Single Cell Stranded Kit w/o LP	96 回用	RML-111
分解 RNA からの NGS 解析用 cDNA 調製キット Fortissimo[™], GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Kit for Degraded RNA	96 回用	RMF-111

[7] 参考文献

- (1) Hayashi T., et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9:619 (2018)

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
京橋 One Terrace
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－

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 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.jp/>