

【GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy®- 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 µL 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。
--	-----------------	---