

製品コード NN0003
NN0004

研究用

Takara

ssDNA-Seq Kit

説明書

目次

I.	内容.....	4
II.	保存.....	4
III.	本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの).....	4
IV.	インプット DNA について.....	5
	IV-1. インプット DNA の要件.....	5
	IV-2. インプット DNA の濃度とサイズの測定.....	5
	IV-3. インプット DNA の断片化.....	6
V.	操作上の注意.....	7
VI.	操作.....	8
	VI-1. インプット DNA の調製.....	9
	VI-2. 前処理 & 変性反応.....	9
	VI-3. 1st adapter ライゲーション反応.....	9
	VI-4. 伸長反応.....	10
	VI-5. ライブラリー調製.....	10
	VI-5A. ライブラリー調製 (インプット量 >10 ng).....	11
	VI-5A-1. 2nd adapter ライゲーション反応.....	11
	VI-5A-2. 精製.....	11
	VI-5B. ライブラリー調製 (インプット量 ≤10 ng).....	12
	VI-5B-1. 精製 (1 回目).....	12
	VI-5B-2. 2nd adapter ライゲーション反応.....	13
	VI-5B-3. 精製 (2 回目).....	14
	VI-6. DNA ライブラリーの PCR 増幅.....	15
	VI-7. DNA ライブラリー精製.....	16
	VI-8. DNA ライブラリー濃度とサイズの評価.....	17
VII.	シーケンシング.....	18
VIII.	データ解析.....	18
IX.	トラブルシューティング.....	18
X.	参考文献.....	19
XI.	関連製品.....	19
XII.	注意.....	19

本製品は、一本鎖 DNA (single-strand DNA : ssDNA) および二本鎖 DNA (double-strand DNA : dsDNA) からイルミナ社の次世代シーケンサー (NGS) 用ライブラリーを調製するキットです。本製品は、サンプルに含まれるすべての DNA を ssDNA としたうえで、ssDNA 同士を結合できる Single strand DNA Ligase (SDL) を用いることで、ssDNA と dsDNA の両方を解析できる点が特徴です。これにより、従来の dsDNA の NGS ライブラリー調製で失われていた ssDNA、損傷および分解を受けた dsDNA に対応でき、断片化の進んだ DNA であっても安定したライブラリー収量を得られます。セルフリー DNA、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料由来 DNA、ssDNA、ssDNA と dsDNA の混合物、環境 DNA、ウイルスゲノム、短鎖 DNA、DNA アプタマー、合成オリゴといった様々な DNA サンプルからライブラリーを調製し、解析に用いることが可能です。さらに、極微量 DNA (10 pg) や Ultra-short ssDNA (50 base) からの解析も可能です。

ライブラリー調製は以下の 5 つのステップで構成されます。

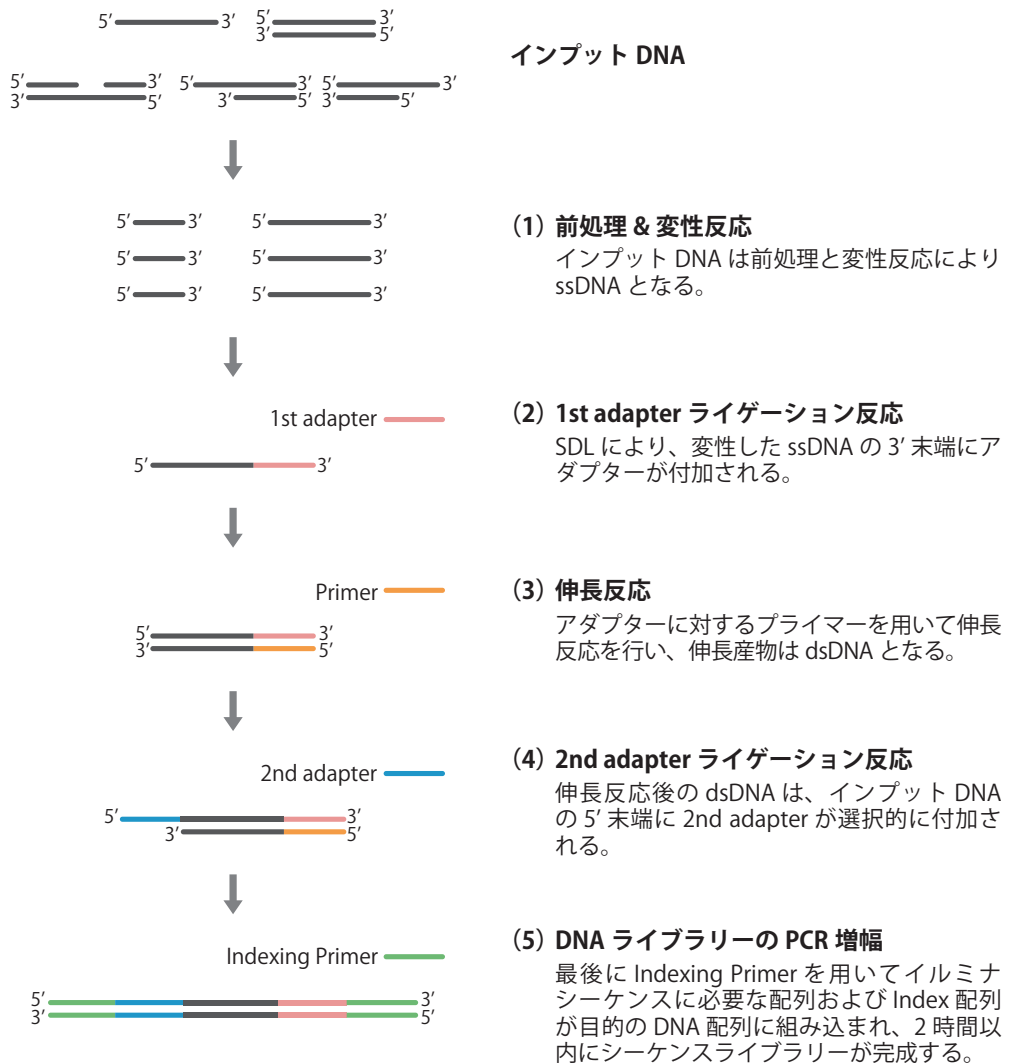


図 1. ライブラリー調製フロー

I. 内容 [24 回分 (NN0003) / 96 回分 (NN0004)]

	製品コード NN0003	NN0004
① Preparation enzyme	24 μ l	96 μ l
② Preparation buffer	48 μ l	192 μ l
(*) TE buffer	1 ml \times 3	6 ml \times 2
③ SDL enzyme	48 μ l	192 μ l
④ SDL buffer	600 μ l	1.2 ml \times 2
⑤ SDL adapter	24 μ l	96 μ l
⑥ Extension polymerase Premix	600 μ l \times 2	1.2 ml \times 4
⑦ Extension primer	24 μ l	96 μ l
⑧ VDC enzyme	24 μ l	96 μ l
⑨ VDC buffer	150 μ l	600 μ l
⑩ PCR polymerase Premix	600 μ l	1.2 ml \times 2

* : TE buffer のコンポーネントカラーは以下です。
NN0003 : ○ (白色)
NN0004 : (コンポーネントカラー無し)

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

- Unique Dual Index Kit (製品コード 634752~634756)
- NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500)
- サーマルサイクラー
 - Clontech PCR Thermal Cycler GP (製品コード WN400) 等
- 80% (v/v) エタノール (用時調製)
- マイクロ遠心機 (スピンドアウン可能なもの)
- ボルテックスミキサー
- マグネットスタンド
- 0.2 ml PCR tube
 - 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
 - 0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300) 等
- 96well PCR plate
 - 0.2ml 96well-plate for Real Time (Frosted) (製品コード NJ401)
 - 96 well snap plate (製品コード NJ710) 等
- PCR plate seal (plate を使う場合)
- 1.5 ml DNA Low-Bind tube
- Bioanalyzer もしくは TapeStation (ともに Agilent 社)
- Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific 社)

IV. インプット DNA について

IV-1. インプット DNA の要件

項目	要件
形状	• ssDNA • dsDNA • ssDNA と dsDNA 混合物
種類	• ゲノム DNA • セルフリー DNA • ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料由来 DNA • 古代 DNA • 環境 DNA • ウイルスゲノム • 短鎖 DNA • 合成オリゴ • DNA アプタマー
DNA サイズ	50～600 bp (50～600 base)
インプット量	10 pg～250 ng
インプット液量	最大 18 μ l
調製用 buffer	TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA)

- 本製品は RNA に適していません。
- 合成オリゴを用いる際には、両末端に修飾を施すことはできませんが、リン酸基末端の合成オリゴの使用は可能です。
- インタクトな細胞を用いることはできません。

IV-2. インプット DNA の濃度とサイズの測定

サンプル種類	推奨の定量方法
ssDNA	Qubit ssDNA assay kit
dsDNA	Qubit dsDNA HS assay kit
ssDNA と dsDNA 混合物	Qubit dsDNA HS assay Kit (dsDNA の定量結果を参照)

- インプット DNA 濃度の定量には、Qubit Fluorometer もしくはそれに相当する試薬および機器を使用してください。
- dsDNA のサイズ測定は Bioanalyzer もしくは TapeStation で行います。ssDNA のサイズ測定は、変性剤 (尿素やホルムアミド) 存在下のポリアクリルアミド電気泳動で確認します。
- 合成オリゴのサイズが既知である場合は、必ずしも測定する必要はありません。

IV-3. インプット DNA の断片化

Bioanalyzer もしくは TapeStation で確認したインプット DNA のメインピークのサイズが 600 bp を超える場合は、超音波破碎もしくは酵素的断片化等の方法で断片化処理を行います。断片化は装置あるいは酵素の取扱説明書に従い、メインピークのサイズが 50～600 bp となるように行ってください。

<超音波破碎により断片化したヒト dsDNA の TapeStation を用いた断片化サイズの評価>

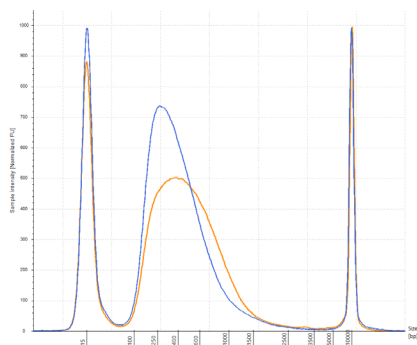


図 2. 断片化によりメインピークのサイズが 50～600 bp の範囲となった例

青 : メインピークのサイズが約 250 bp を示すインプット DNA
オレンジ : メインピークのサイズが約 400 bp を示すインプット DNA

< FFPE 試料から抽出した DNA の TapeStation を用いた断片化サイズの評価>

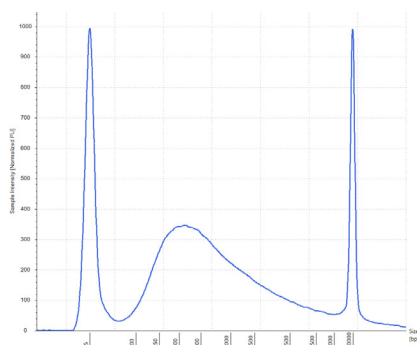


図 3. メインピークのサイズが 50～600 bp の範囲にあり断片化が不要な例

DIN 値 : 1.6 (TapeStation ; Agilent 社)
Long/short 比 : 0.02 (Takara FFPE DNA QC All-in-One Kit ; 製品コード NN0001)

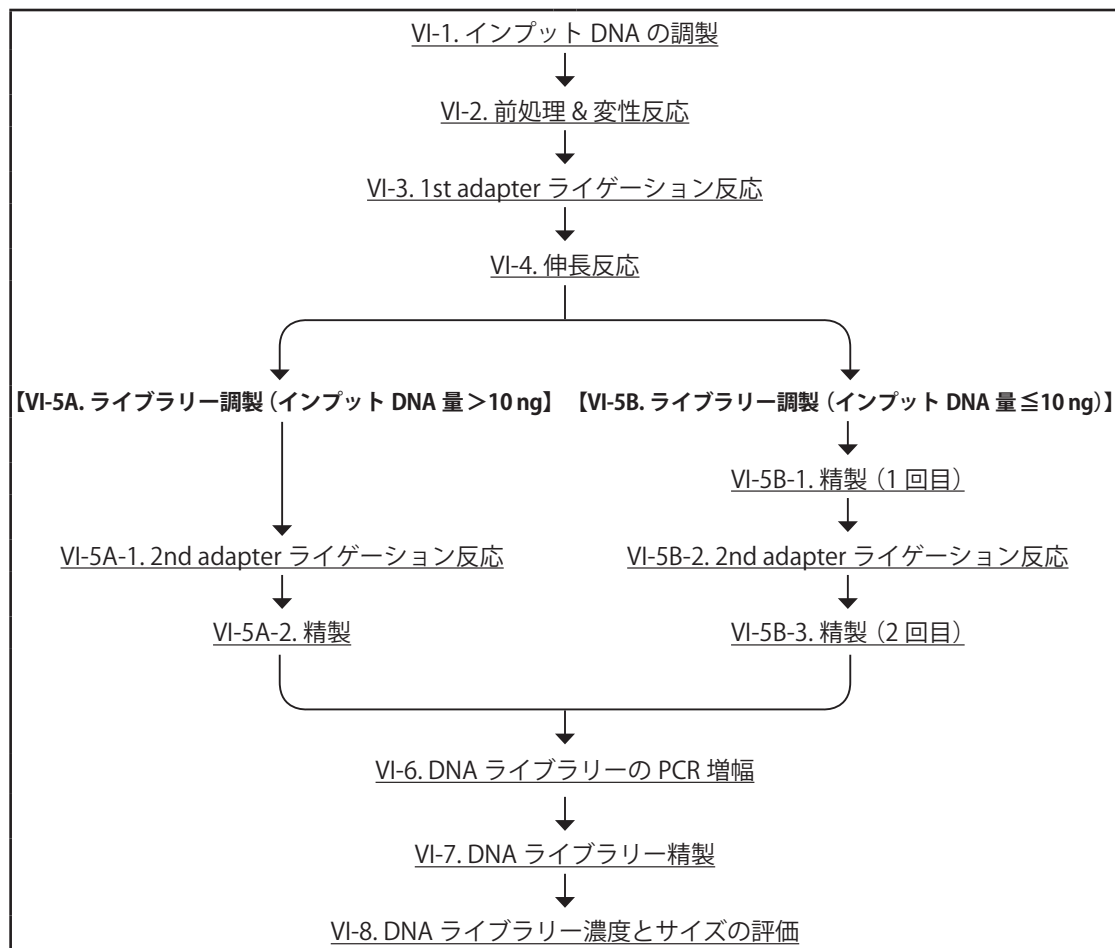
V. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 本製品は、調製時のピペッティングの分注精度に敏感です。正しく校正されたピペットを使用してください。
2. 酵素 (enzyme および polymerase Premix) は使用前に氷上で融解し、スピンドウンします。その後、ピペッティングもしくはタッピングで十分に混合し、スピンドウンしてください。
3. 酵素以外のコンポーネントは使用前に室温で融解し、スピンドウンします。十分に混合した後、再度スピンドウンしてください。
4. 各反応液を作製する際には、ピペッティングによるロスを考慮して必要量 + α 分の作製を推奨します。酵素は最後に添加し、十分な混合を行ってください。
5. 1st adapter のライゲーション反応までのすべての試薬は、核酸およびヌクレアーゼフリーのキャビネット内で保管し、作業を行ってください。また、インプット DNA、DNA ライブラリー、Indexing Primer のコンタミネーションリスクを低減するために、PCR 増幅以降の作業は PCR 産物を扱うエリアで実施してください。
6. 繰り返しの凍結融解は避けてください。
7. すべての作業は氷上で行ってください。

VI. 操作

操作の概要



- インプット DNA の量により「VI-5. ライブラリー調製」の操作が異なりますが、それ以外の操作は共通です。
- 0.2 ml PCR tube を使用する方法を記載していますが、96 well plate での実施も可能です。
- 本製品が適切に機能していることを確認するためにコントロールサンプルの使用を推奨します。

ポジティブコントロール

超音波破碎もしくは酵素により 200～400 bp 程度に断片化したヒトゲノム DNA もしくは合成 ssDNA オリゴ 160 base

ネガティブコントロール

本製品のコンポーネントの TE buffer 18 μ l

VI-1. インプット DNA の調製

液量が 18 μ l になるようにインプット DNA を調製する。

試薬	使用量
インプット DNA	x μ l
(*1) TE buffer	Up to 18 μ l

* 1 : TE buffer のコンポーネントカラーは以下です。
NN0003 : ○ (白色)、NN0004 : (コンポーネントカラー無し)

VI-2. 前処理 & 変性反応

1) 下記組成の前処理反応液を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
① Preparation enzyme	1 μ l
② Preparation buffer	2 μ l
Total	3 μ l

- 2) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 3) インプット DNA 18 μ l に前処理反応液 3 μ l を添加する (合計 21 μ l)。
- 4) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 5) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

37°C 15 分
95°C 5 分
4°C Hold

6) 反応終了後、スピンドウンを行い、同一の tube で次の工程に速やかに進む。

VI-3. 1st adapter ライゲーション反応

1) 下記組成のライゲーション反応液を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
③ SDL enzyme	2 μ l
④ SDL buffer	25 μ l
⑤ SDL adapter	1 μ l
Total	28 μ l

- 2) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 3) 前処理産物 21 μ l にライゲーション反応液 28 μ l を添加する (合計 49 μ l)。
- 4) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 5) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

37°C 15 分
95°C 5 分
4°C Hold

6) 反応終了後、スピンドウンを行い、同一の tube で次の工程に速やかに進む。

VI-4. 伸長反応

- 1) 下記組成の伸長反応液を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
⑥ Extension polymerase Premix	49 μ l
⑦ Extension primer	1 μ l
Total	50 μ l

- 2) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
3) 1st adapter ライゲーション産物 49 μ l に伸長反応液 50 μ l を添加する (合計 99 μ l)。
4) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
5) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

95°C	30 秒
60°C	30 秒
68°C	5 分
4°C	Hold

- 6) 反応終了後、スピンドウンを行い、同一の tube で次の工程に速やかに進む。

VI-5. ライブラリー調製

インプット DNA 量	プロトコール
> 10 ng	VI-5A へ進む
\leq 10 ng	VI-5B へ進む

- ・インプット量が 10 ng を超える場合は、【VI-5A. ライブラリー調製 (インプット DNA 量 > 10 ng)】を実施してください。
- ・インプット DNA 量が 10 ng を超えない、または短鎖 DNA (50~160 bp) を解析する場合は、【VI-5B. ライブラリー調製 (インプット DNA 量 \leq 10 ng)】を実施してください。このプロトコールでは追加のビーズ精製を行うことで、低インプット DNA 量からのライブラリー調製や短鎖 DNA からのライブラリー調製において、より高いライブラリー収量を得ることができません。短鎖 DNA からのライブラリー調製では、さらにビーズ比率を変更することで短鎖 DNA の消失を防ぎ、安定したライブラリー収量を得ることが可能です。

【VI-5A. ライブラリー調製 (インプット DNA 量 > 10 ng)】

VI-5A-1. 2nd adapter ライゲーション反応

- 1) 伸長産物 99 μl に ③ VDC enzyme 1 μl を添加する (合計 100 μl)。
- 2) ピペティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 3) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

25°C 15分
4°C Hold

- 4) 反応終了後、スピンドウンを行い、同一の tube で次の工程に速やかに進む。

VI-5A-2. 精製

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/50/500) を使用し、下記手順に従って精製を実施する。

[使用上の注意]

- ・用時調製した 80%エタノールを使用してください。
- ・ビーズからエタノールを蒸発させる際は、ビーズの光沢がなくなる程度が目安です。ビーズを過度に乾燥させないでください。目的 DNA の回収率が低下する可能性があります。

- 1) NucleoMag NGS Clean-up and Size Select を室温に約 30 分間静置して、ビーズ溶液を室温に戻す。
- 2) ビーズ溶液を均一な色になるまでボルテックスする。
- 3) 2nd adapter ライゲーション産物 100 μl にビーズ溶液 100 μl を加える。
- 4) ボルテックスで懸濁した後、室温で 5 分間静置する。
- 5) スピンドウンする。
- 6) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 7) ピペットで上清を取り除く。
- 8) 磁気スタンドに置いたまま、ビーズに触れずに 80%エタノール 200 μl を加える。
- 9) 磁気スタンドに置いたまま、室温で 30 秒間静置する。
- 10) 磁気スタンドに置いたまま、ピペットでエタノールを取り除く。
- 11) 8) ~ 10) の作業をもう 1 回繰り返した後に、スピンドウンする。
- 12) スピンドウン後、磁気スタンドに置き、残留したエタノールをピペットで除去する。
- 13) 磁気スタンドに置いたまま蓋を開けて室温で静置し、エタノールを蒸発させる。
- 14) ビーズの乾燥後、磁気スタンドに置いたまま TE buffer 21 μl を加えて、蓋を閉める。
- 15) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドから取り出し、ボルテックスで懸濁した後に室温で 2 分間静置する。
- 16) スピンドウンする。
- 17) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 18) 上清 20 μl を新しい 0.2 ml PCR tube に移す。

< Safe Stopping Point >

作業を中断する場合は、精製産物を -20°C 以下に保存後、1 週間以内に作業を再開してください。再開時にはスピンドウンを行ってから次の工程へ進んでください。

※ 以後、「VI-6. DNA ライブラリーの PCR 増幅」の工程へ進んでください。

【VI-5B. ライブラリー調製 (インプット DNA 量 ≤ 10 ng)】

VI-5B-1. 精製 (1 回目)

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500) を使用し、下記手順に従って精製を実施する。

[使用上の注意]

- ・用時調製した 80%エタノールを使用してください。
- ・ビーズからエタノールを蒸発させる際は、ビーズの光沢がなくなる程度が目安です。ビーズを過度に乾燥させないでください。目的 DNA の回収率が低下する可能性があります。

- 1) NucleoMag NGS Clean-up and Size Select を室温に約 30 分間静置して、ビーズ溶液を室温に戻す。
- 2) ビーズ溶液を均一な色になるまでボルテックスする。
- 3) 伸長産物 99 μ l にビーズ溶液 99 μ l を加える。
- 4) ボルテックスで懸濁した後、室温で 5 分間静置する。
- 5) スピンドアウンする。
- 6) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 7) ピペットで上清を取り除く。
- 8) 磁気スタンドに置いたまま、ビーズに触れずに 80%エタノール 200 μ l を加える。
- 9) 磁気スタンドに置いたまま、室温で 30 秒間静置する。
- 10) 磁気スタンドに置いたまま、ピペットでエタノールを取り除く。
- 11) 8) ~ 10) の作業をもう 1 回繰り返した後に、スピンドアウンする。
- 12) スピンドアウン後、磁気スタンドに置き、残留したエタノールをピペットで除去する。
- 13) 磁気スタンドに置いたまま蓋を開けて室温で静置し、エタノールを蒸発させる。
- 14) ビーズの乾燥後、磁気スタンドに置いたまま TE buffer 24 μ l を加えて、蓋を閉める。
- 15) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドから取り出し、ボルテックスで懸濁した後に室温で 2 分間静置する。
- 16) スピンドアウンする。
- 17) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 18) 上清 23 μ l を新しい 0.2 ml PCR tube に移す。

< Safe Stopping Point >

作業を中断する場合は、精製産物を -20°C 以下に保存後、1 週間以内に作業を再開してください。再開時にはスピンドアウンを行ってから次の工程へ進んでください。

VI-5B-2. 2nd adapter ライゲーション反応

- 1) 下記組成のライゲーション反応液を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
⑧ VDC enzyme	1 μ l
⑨ VDC buffer	6 μ l
Total	7 μ l

- 2) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
3) 1回目の精製産物 23 μ l にライゲーション反応液 7 μ l を添加する (合計 30 μ l)。
4) ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
5) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

25°C 15 分
4°C Hold

- 6) 反応終了後、スピンドウンを行い、同一の tube で次の工程に速やかに進む。

VI-5B-3. 精製 (2 回目)

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500) を使用し、下記手順に従って精製を実施する。

[使用上の注意]

- ・用時調製した 80%エタノールを使用してください。
- ・ビーズからエタノールを蒸発させる際は、ビーズの光沢がなくなる程度が目安です。ビーズを過度に乾燥させないでください。目的 DNA の回収率が低下する可能性があります。

※ インプット DNA のサイズと添加ビーズ溶液の推奨条件は下記をご参照ください。

インプット DNA のサイズ	添加ビーズ溶液
50 ~ 160 bp	60 μ l
160 bp \leq	30 μ l

- ・ 上記の両方のサイズを含むライブラリーを調製する場合は、ビーズ溶液 60 μ l を添加する。
- 1) NucleoMag NGS Clean-up and Size Select を室温に約 30 分間静置して、ビーズ溶液を室温に戻す。
 - 2) ビーズ溶液を均一な色になるまでボルテックスする。
 - 3) 2nd adapter ライゲーション産物 30 μ l にインプット DNA のサイズに応じた上記のビーズ溶液を加える。
 - 4) ボルテックスで懸濁した後、室温で 5 分間静置する。
 - 5) スピンドアウンする。
 - 6) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
 - 7) ピペットで上清を取り除く。
 - 8) 磁気スタンドに置いたまま、ビーズに触れずに 80%エタノール 200 μ l を加える。
 - 9) 磁気スタンドに置いたまま、室温で 30 秒間静置する。
 - 10) 磁気スタンドに置いたまま、ピペットでエタノールを取り除く。
 - 11) 8) ~ 10) の作業をもう 1 回繰り返した後に、スピンドアウンする。
 - 12) スピンドアウン後、磁気スタンドに置き、残留したエタノールをピペットで除去する。
 - 13) 磁気スタンドに置いたまま蓋を開けて室温で静置し、エタノールを蒸発させる。
 - 14) ビーズの乾燥後、磁気スタンドに置いたまま TE buffer 21 μ l を加えて、蓋を閉める。
 - 15) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドから取り出し、ボルテックスで懸濁した後に室温で 2 分間静置する。
 - 16) スピンドアウンする。
 - 17) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
 - 18) 上清 20 μ l を新しい 0.2 ml PCR tube に移す。

< Safe Stopping Point >

作業を中断する場合は、精製産物を - 20℃以下に保存後、1 週間以内に作業を再開してください。再開時にはスピンドアウンを行ってから次の工程へ進んでください。

※ 以後、「VI-6. DNA ライブラリーの PCR 増幅」の工程へ進んでください。

VI-6. DNA ライブラリーの PCR 増幅

デュアルインデックスPCRプライマーを含むUnique Dual Index Kit(製品コード 634752～634756)と組み合わせて使用し、DNA ライブラリーのPCR増幅工程でサンプルごとに固有のIndex配列を付与する。

[使用上の注意]

- 必ず Unique Dual Index Kit (製品コード 634752～634756)を使用してください。他のインデックス試薬での代用はできません。
- 複数のサンプルを同時にシーケンスするためには、サンプルごとに異なるインデックスを付与してください。
- Unique Dual Index Kit は室温で融解した後、ボルテックスおよびスピンドウンしてください。
- Unique Dual Index Kit と PCR polymerase Premix の混合溶液は作製しないでください。
- コンタミネーションを避けるために、Unique Dual Index Kit の各 Indexing Primer を添加するたびにピペットのチップを必ず交換してください。
- インプット DNA、DNA ライブラリー、Indexing Primer のコンタミネーションリスクを低減するために、PCR 増幅以降の作業は PCR 産物を扱うエリアで実施してください。

- 1) 精製産物 20 μ l に Unique Dual Index Kit の各 Indexing Primer を 5 μ l ずつ添加する。
- 2) ④ PCR polymerase Premix 25 μ l を添加し、ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンドウンする。
- 3) 蓋をしっかりと閉め、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて反応を実施する。

[反応条件]

98°C 2分
↓
95°C 20秒
65°C 30秒 } x サイクル*2
↓
68°C 5分
4°C Hold

* 2 : 増幅サイクル数は下記をご参照ください。

インプット DNA 量	サイクル数
10 pg	19～20
100 pg	15～16
1 ng	12～13
10 ng	10～11
100 ng	6～7
250 ng	4～5

[使用上の注意]

- サイクル数はインプット DNA 量だけでなく、サンプル品質や種類によって最適化が必要です。
- インプット DNA 量に対して過剰なサイクル数を用いた場合は、PCR Artifact (Bioanalyzer や TapeStation で確認される目的外の高分子のピーク) が発生する可能性があります。

VI-7. DNA ライブラリー精製

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500) を使用し、下記手順に従って精製を実施する。

[使用上の注意]

- ・用時調製した 80%エタノールを使用してください。
- ・ビーズからエタノールを蒸発させる際は、ビーズの光沢がなくなる程度が目安です。ビーズを過度に乾燥させないでください。目的 DNA の回収率が低下する可能性があります。

- 1) NucleoMag NGS Clean-up and Size Select を室温に約 30 分間静置して、ビーズ溶液を室温に戻す。
- 2) ビーズ溶液を均一な色になるまでボルテックスする。
- 3) PCR 産物 50 μ l にビーズ溶液 50 μ l を加える。
- 4) ボルテックスで懸濁した後、室温で 5 分間静置する。
- 5) スピンドアウンする。
- 6) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 7) ピペットで上清を取り除く。
- 8) 磁気スタンドに置いたまま、ビーズに触れずに 80%エタノール 200 μ l を加える。
- 9) 磁気スタンドに置いたまま、室温で 30 秒間静置する。
- 10) 磁気スタンドに置いたまま、ピペットでエタノールを取り除く。
- 11) 8) ~ 10) の作業をもう 1 回繰り返した後に、スピンドアウンする。
- 12) スピンドアウン後、磁気スタンドに置き、残留したエタノールをピペットで除去する。
- 13) 磁気スタンドに置いたまま蓋を開けて室温で静置し、エタノールを蒸発させる。
- 14) ビーズの乾燥後、磁気スタンドに置いたまま TE buffer 31 μ l を加えて、蓋を閉める。
- 15) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドから取り出し、ボルテックスで懸濁した後に室温で 2 分間静置する。
- 16) スピンドアウンする。
- 17) 0.2 ml PCR tube を磁気スタンドに置き、液体が透明になるまで静置する。
- 18) 上清 30 μ l を新しい 0.2 ml PCR tube に移す。

※ 精製した DNA ライブラリーは、 -20°C 以下で保存可能です。

VI-8. DNA ライブラリー濃度とサイズの評価

Bioanalyzer もしくは TapeStation で DNA ライブラリーの濃度とサイズを測定する。測定する DNA ライブラリーは機器の測定範囲内の濃度にするために、Qubit Fluorometer もしくはそれに相当する機器および試薬により定量した DNA 濃度に基づき、TE buffer で希釈したものを使用する。

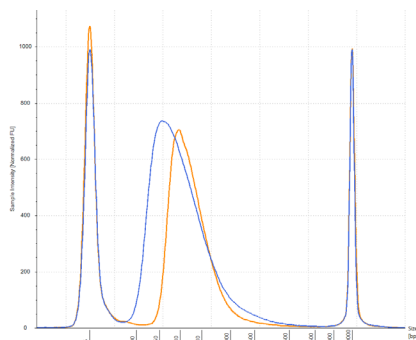


図 5. 断片化ヒト DNA から調製した DNA ライブラリーの例 (TapeStation で評価)

青 : インput DNA

オレンジ : 断片化ヒト DNA の DNA ライブラリー

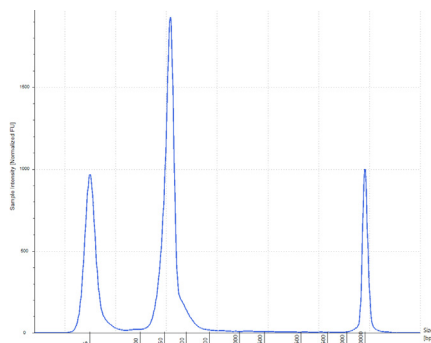


図 6. 合成 ssDNA オリゴ 160 base から調製した DNA ライブラリーの例 (TapeStation で評価)

VII. シーケンシング

本製品により調製された DNA ライブラリーは、イルミナ社の次世代シーケンサーで解析可能なライブラリー構造を持ちます。各サンプルから調製されたライブラリーには、PCR 増幅時に選択された特定のインデックス情報が含まれており、複数の DNA ライブラリーを混合し同時にシーケンスする際には、インデックスが重複していないことを確認し混合してください。シーケンシングについてはシーケンサーの取扱説明書をご参考ください。

[使用上の注意]

- Unique Dual Index Kit (製品コード 634752～634756) は 4 色法および 2 色法 SBS ケミストリーのイルミナ社シーケンサーに適合しています。1 色法 SBS ケミストリーのイルミナ社シーケンサーへの適合に関しては検証されていません。
- PCR 産物等の多様性の低いサンプルのシーケンシングについて、Q スコア (シーケンスクオリティスコア) の低下が確認される場合は、調製した DNA ライブラリーに PhiX Control (Illumina) を添加しシーケンシングすることで、Q スコアの改善が期待できます。

VIII. データ解析

DNA ライブラリーにおけるインサート DNA の 5' 末端は 5 塩基の固有配列 (CCCTT) が付加されています。Read 2 の最初の 5 塩基をトリミングしたリードを解析に用いてください。

IX. トラブルシューティング

問題	原因	解決案
ライブラリー収量がない	インプット DNA の不添加	目的サンプルのライブラリー調製と同時にコントロールサンプルのライブラリー調製を実施する。
ライブラリー収量が低い	インプット DNA の品質が低い	インプット DNA 量、もしくは PCR のサイクル数を増やす。
	ビーズの過度な乾燥による DNA 溶出の不良	精製ビーズを TE buffer に完全に溶解するまで、ピペッティングもしくはボルテックスを行う。
アダプターダイマー (約 120 bp) が発生する	インプット DNA に含まれる反応阻害物質	インプット DNA を TE buffer で希釈する。
	インプット DNA 量が少ない	インプット DNA 量を増やす。
ライブラリーのピークが複数存在する	インプット DNA に含まれる長さの異なる DNA	問題ないので、そのまま解析を続ける。
	PCR Artifact (Bioanalyzer や TapeStation で確認される目的外の高分子のピーク)	インプット DNA 量を減らす、もしくは PCR のサイクル数を減らす。
マッピング率が低い	目的以外の DNA コンタミネーション	インプット DNA の再調製を行う。

X. 参考文献

Miura, Fumihito *et al.* Identification of an enzyme with strong single-stranded DNA ligation activity and its application for sequencing. *Nucleic acids research.* (2025) **53**: 3.

XI. 関連製品

Unique Dual Index Kit (製品コード 634752～634756)
NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500)
Takara FFPE DNA QC All-in-One Kit (製品コード NN0001)
Clontech PCR Thermal Cycler GP (製品コード WN400)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2ml 96well-plate for Real Time (Frosted) (製品コード NJ401)
96 well snap plate (製品コード NJ710)

XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社