

NEBNext UltraExpress™ DNA Library Prep Kit

NEB #E3325S/L

24/96 reactions

英語版マニュアル Version 2.0 9/25 に対応

目次：

概要	2
プロトコール	3
エンドプレップ	3
アダプターライゲーション	3
アダプター付加 DNA の PCR 増幅	4
PCR 増幅産物の Phased Beads クリーンアップ	5
Appendix A：インプット量ごとのアダプター希釈および PCR サイクル数の推奨設定	7
キット構成	8
改訂履歴	8

本日本語版マニュアルは、オリジナル英語版マニュアル Version 2.0 に基づいて作成しています。製品のご使用にあたり、必ずウェブサイト製品ページより最新の英語版マニュアルをご確認ください (<https://www.neb.com/ja-jp/products/e3325nebnext-express-dna-library-prep-kit>)。

ライブラリーキットの内容：

キットには最大 24 反応 (NEB #E3325S) および 96 反応 (NEB #E3325L) の調製に十分な液量の試薬が含まれている。すべての試薬は -20°C で保存すること。行頭記号の色は、試薬チューブのキャップの色を示す。

Package 1： -20°C で保存

- (緑色) NEBNext[®] UltraExpress End Prep Enzyme Mix
- (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer
- (赤色) NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix
- (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix
- (白色) 0.1X TE
- (白色) NEBNext Bead Reconstitution Buffer

キットの他に別途準備が必要なもの：

- 80%エタノール (用事調製)
- ヌクレアーゼフリー水
- DNA LoBind[®] Tubes (Eppendorf[®] #022431021)
- DNase-、RNase-free 0.2 ml PCR チューブ (サーマルサイクラー推奨のものを使用)
- NEBNext Multiplex Oligos for Illumina[®]
詳細については www.neb.com/oligos を参照
- SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter[®], Inc. #B23317) または AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
- マグネットラック/スタンド (参考製品：NEB #S1515S)
- サーマルサイクラー
- Covaris[®] instrument (ME220 または ML230)
- Agilent[®] Bioanalyzer[®] や TapeStation などの DNA/RNA 定性解析装置およびチップ
- UV/Vis 吸光度計 (Thermo Scientific[™] NanoDrop[™] または Lunatic (Unchained Labs) など)

概要：

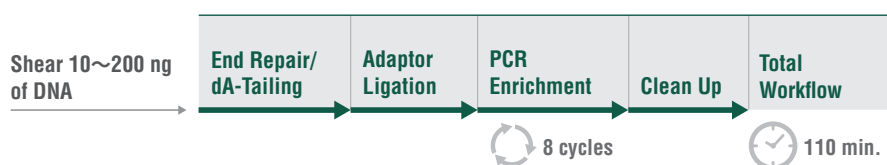
NEBNext UltraExpress DNA Library Prep Kit には、Illumina プラットフォームでの次世代シーケンシングのための、高速かつ高品質なライブラリー調製のために必要な酵素とバッファーが含まれている。NEBNext UltraExpress DNA Library Prep Kit は、10 ~ 200 ng の DNA に対応している。高速かつシンプルなワークフローにより、作業時間を最小限に抑えることが可能である。また、インプット量によらず、単一のアダプター希釈および PCR サイクルを使用できる。また、ライブラリー調製がシングルチューブで完了するため、プラスチック廃棄物を減らすことが可能である。通常のプロトコールに加えて、ライブラリー収量の最適化のための、インプット DNA 量ごとのアダプター希釈率や PCR サイクル数の目安を Appendix に記載している。

より大容量の試薬が必要な場合には、カスタム包装およびバルク包装の製品を NEB の OEM/Bulks 部門から購入できる。

問い合わせ先：tech.jp@neb.com



本製品に関するよくある質問については、NEB.com の製品ページを参照すること。

図 1：NEBNext UltraExpress DNA ワークフロー



プロトコール:

プロトコールの一時停止可能なポイント

-  プロトコールの一時停止可能なポイント。
-  プロトコール中で本記号が付いたステップでは、複数の方法から1つを選択する。選択すべき方法はインプット DNA 量などにより異なる。
- 行頭記号の色は反応に使用する試薬のキャップの色を示す。

Starting Material: 10 ~ 200 ng のインプット DNA (約 200 bp に断片化済) を使用する。DNA は 1X TE 中で前もって断片化することが推奨される。18 µl の液量で断片化し、15 µl の断片化済み DNA をエンドブレップ反応に使用すること。

1. エンドブレップ

- 1.1. 滅菌済みマイクロチューブに以下の構成成分を添加する。

試薬	1 反応あたりの液量
● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer	2.3 µl
● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix	1.0 µl
0.1X TE	1.7 µl
断片化 DNA	15 µl
全液量	20 µl


注意: 十分に混合することが重要である。少量の気泡が存在しても反応には影響しない。

- 1.2. Heat lid を 75°C 以上に設定したサーマルサイクラー内にチューブを設置し、以下のプログラムを実行する。

20°C、15 分

65°C、15 分

4°C、保持

-  -20°C で保存可能ではあるものの、若干の収量低下 (約 20%) が起こる。そのため、ここで停止せずに次のアダプターライゲーションまで進むことを推奨する。

2. アダプターライゲーション

- 2.1. ステップ 1.2 のエンドブレップ反応液に下記の試薬を氷上にて追添加する。

試薬	1 反応あたりの液量
エンドブレップ反応液 (Section 1 のステップ 1.2.)	20 µl
● (赤色) NEBNext Adaptor for Illumina*	2 µl
● (赤色) NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix**	10 µl
全液量	32 µl

* NEBNext アダプターは、別売の NEBNext Multiplex Oligos for Illumina に付属している。詳細については www.neb.com/oligos を参照すること。

** NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix は、使用前に複数回ピペティングして混合しておくこと。

注意: NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix と希釈したアダプターを事前に混合しないこと。

- 2.2. 100 µl のピペットを 30 µl にセットし、10 回以上ピペティングして完全に混合する。スピンドウンによりチューブ内の側面から全液体を回収する。

注意: NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix は粘性が非常に高い。ライゲーション反応溶液の混合が不完全であるとライゲーション効率が低下するため、十分に混合すること。少量の気泡が存在しても性能には影響しない。

- 2.3. Heat lid をオフにして、サーマルサイクラー内にチューブを設置し、20°C で 15 分インキュベートする。

- 2.4. ステップ 2.3. の反応液に 2 µl の ● (赤色) USER® Enzyme を追添加し、全液量は 34 µl になる。30 µl にセットしたピペットでゆっくりと 10 回混合する。

2.5. Heat lid を 47°C以上に設定したサーマルサイクラー内にチューブを設置し、以下のプログラムを実行する。

37°C、5分

4°C、保持



サンプルは -20°Cで 3 日間まで保存可能である。

3. アダプター付加 DNA の PCR 増幅



Forward/Reverse プライマーが個別のチューブに含まれる NEBNext Index Primer を使用する場合は、3.1.1A. に従う。各プライマーの濃度は 10 μM である。

Forward/Reverse プライマーミックスがあらかじめ混合されている NEBNext Index Primer を使用する場合は、3.1.1B. に従う。各プライマー濃度は 5 μM、合計で 10 μM である。

3.1. PCR 増幅

3.1.1. ステップ 2.5. のアダプター付加 DNA に以下の構成成分を添加する。

3.1.1A. Forward/Reverse プライマーが個別のチューブに含まれている場合

試薬	1 反応あたりの液量
アダプター付加 DNA (ステップ 2.5.)	34 μl
● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix	40 μl
● (青色) Index Primer/i7 Primer ^{** **}	3 μl
● (青色) Universal PCR Primer/i5 Primer ^{** **}	3 μl
全液量	80 μl

3.1.1B. Forward/Reverse プライマーが 1 つのチューブに含まれている場合 (プレミックス)

試薬	1 反応あたりの液量
アダプター付加 DNA (ステップ 2.5.)	34 μl
● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix	40 μl
● (青色) Index/Universal Primer ^{** **}	6 μl
全液量	80 μl

* NEBNext Multiplex Oligos for Illumina はキット本体には付属しない。また、有効なインデックスプライマーの組み合わせについては、NEBNext Index Oligo Selector (<https://indexoligo.neb.com/>) を確認すること。

** 各サンプルに対し、1 種類の i7 Primer/i7 index primer を使用すること。
また、各サンプルに対し 1 種類の i5 primer (シングルインデックスの場合には Universal primer) を使用すること。

3.1.2. 100 μl または 200 μl のピペットを 70 μl にセットし、10 回以上ピペッティングして完全に混合して、スピンドウンする。

3.1.3. サーマルサイクラーにチューブをセットし、Heat lid を 105°Cの設定で以下のサイクル条件を用いて PCR を行う。

サイクルステップ	温度	時間	サイクル数
初期変性	98°C	30 秒間	1
変性	98°C	10 秒間	8
アニーリング/伸長	65°C	75 秒間	
最終伸長	65°C	5 分間	1
保持	4°C	∞	

8 サイクルの PCR 増幅により、10 ng から 200 ng までのインプット DNA に対し、シーケンシングに十分なライブラリー収量が得られる。よって、インプット DNA 量のすべての範囲に対して単一の PCR サイクル数での増幅が可能である。

注意：

(1) 25 ng 以上のインプット DNA については、8 サイクルの PCR によってノンリニアな増幅が起こる可能性がある。ノンリニアな増幅が起こった場合には、BioAnalyzer や TapeStation のようなサイズ分布によるライブラリーの定量結果が不正確となる可能性がある。その場合は、NanoDrop や Lunatic のような吸光度計を用いて定量することを推奨する。図 5.1 の例を参照すること。

(2) アダプターの希釈率と PCR サイクル数は高品質なゲノム DNA と NEBNext Adaptor for Illumina を用いて検証されている。他のインプット DNA については、アダプターの希釈率と PCR サイクル数の最適化が必要である。

(3) 特定のライブラリー収量を得るためには、Appendix A を参照しアダプター希釈と PCR サイクル数を最適化すること。

(4) NEBNext Bead Reconstitution Buffer は Phased Cleanup の前に室温に戻しておく必要がある。NEBNext Bead Reconstitution Buffer (AMPure XP を使う場合は AMPure XP も) は 30 分以上かけて室温に戻すこと。

3.1.4. Section 4 の PCR 産物の Phased Beads クリーンアップに進む。

4. PCR 増幅産物の Phased Beads クリーンアップ

注意：本項の SPRIselect/AMPure ビーズの比率は Phased Beads クリーンアップのために最適化されており、他のクリーンアップの比率とは異なる。よって、必ず本プロトコルの比率に従い、一般的なガイドラインや他キットのビーズ比率を使用しないこと。AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

- 4.1. SPRIselect Beads または NEBNext Sample Purification Beads をボルテックスして再懸濁する。懸濁が不十分な場合、DNA 回収量が低下するため、十分に注意する。AMPure XP Beads を使用する場合、懸濁して 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁してから使用する。
- 4.2. 再懸濁したビーズ 56 μ l (0.7 X) を PCR 反応産物 (~ 80 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。最後のピペティングの際には、チップ内の液体をすべて排出するよう注意すること。3 ~ 5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にサンプルをスピンドウンする場合は、ビーズが沈殿し始める前に停止すること。
- 4.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 4.4. マグネットスタンド上に設置し、ビーズを上清から分離する。必要に応じて、マグネットスタンドに置く前に、チューブやプレートウェルの側面から液体を集めるためにスピンドウンすること。
- 4.5. 溶液が透明 (約 5 分間) になったら、上清を注意深く除去して廃棄する。ビーズにはターゲット DNA が結合しているため、触れないように注意する (**注意：ビーズを捨てないこと**)。
- 4.6. マグネットスタンドからチューブまたはプレートを取り除く (**注意：この時点ではエタノールでの洗浄は不要である**)。50 μ l の 0.1X TE を加え、ピペティングにより混合する。50 μ l のビーズ懸濁液に対し、40 μ l (0.8X) の NEBNext Beads Reconstitution Buffer を追添加する。10 回以上ピペティングして混合する。**最後のピペティングの際には、チップ内の液体をすべて排出するよう注意すること**。3 ~ 5 秒のボルテックスによる混合も可能である。混合後にサンプルをスピンドウンする場合は、ビーズが沈殿し始める前に停止すること。
- 4.7. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 4.8. マグネットスタンドにチューブまたはプレートを設置する。必要に応じて、マグネットスタンドに置く前に、チューブやプレートウェルの側面から液体を集めるためにスピンドウンすること。
- 4.9. 溶液が透明 (約 5 分間) になったら、上清を注意深く除去して廃棄する。ビーズにはターゲット DNA が結合しているため、触れないように注意する (**注意：ビーズを捨てないこと**)。
- 4.10. マグネットスタンド内にチューブまたはプレートを設置したまま、80%エタノール 200 μ l (用時調製) を添加する。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を注意深く除去して廃棄する。サンプル DNA が含まれるビーズには触れないこと。
- 4.11. ステップ 4.10. をさらに 1 回繰り返し、合計 2 回の洗浄を行う。2 回目の洗浄で残っているエタノールは完全に除去すること。必要に応じてチューブをスピンドウンし、マグネットラックに再度設置し、P10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
- 4.12. マグネットラック上に設置した状態で、チューブの蓋を開けて最長 5 分間ビーズを風乾させる。

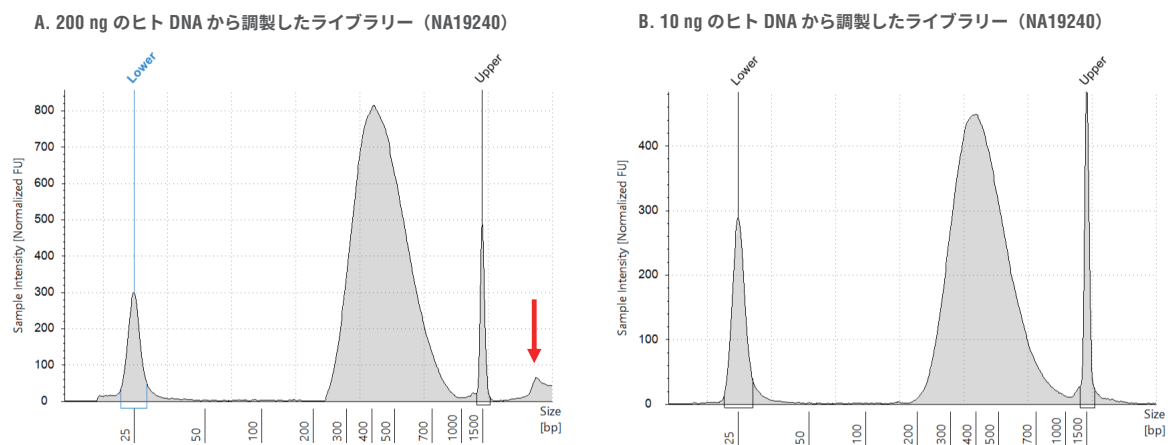
注意：ビーズを過乾燥させないこと。過乾燥により、ターゲット DNA の回収率が低下する可能性がある。目に見える液体はすべて蒸発しているが、ビーズが暗褐色で光沢を有する時点でサンプルを溶出させる。ビーズが淡褐色に変化し亀裂が生じ始めると過乾燥である。

- 4.13. チューブまたはプレートをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 33 μ l の 0.1X TE (キットに付属) を添加して、ターゲット DNA を溶出する。
- 4.14. 10 回のピペティング、またはボルテックスミキサーで十分に混合する。室温で 2 分以上インキュベーションする。必要に応じて、マグネットスタンドに置く前に、チューブやプレートウェルの側面から液体を集めるためにスピンドウンすること。
- 4.15. チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に設置し、溶液が透明 (約 5 分間) になるまで静置しておく。上清の 30 μ l を新しい PCR チューブに移し、-20°C で保存する。
- 4.16. Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip または Agilent High Sensitivity D1000 Screen Tape を用いてライブラリーのサイズ分布を確認する。必要に応じてライブラリーを希釈してから泳動する。



サンプルは -20°C で保存可能である。

図 5.1：ヒトファレンス DNA (NA19240) で調製したライブラリーの泳動像の例



(A) 200 ng および (B) 10 ng のヒト DNA (NA19240) から 8 サイクルの PCR 増幅で作成したライブラリーを、HSD1000 ScreenTape® を用いて TapeStation で絵移動した。図 A の 200 ng サンプルにおいて、Upper を超えるピークが観測される (赤矢印)。これは、PCR サイクルが多いことによって生じる、ノンリニアな増幅産物に由来している。この増幅産物はシーケンスの結果には悪影響を与えないものの、ScreenTape 上での移動速度の差異により、ライブラリー濃度の定量精度が低下する恐れがある。そのため、このようなピークが観測された場合には、400 bp または目的のライブラリーサイズを用いて、NanoDrop または Lunatic 等の分光光度計を用いてライブラリー濃度を測定し、濃度値をナノモル単位に変換することを推奨する。

Appendix A

インプット量ごとのアダプター希釈および PCR サイクル数の推奨設定

本キットはインプット量によらず共通のアダプター希釈および PCR サイクル数でライブラリー調製が可能であるが、インプット量ごとに変更することもできる。

表 1 は、NEBNext Adaptor for Illumina を希釈せずに使用した場合において、インプット量ごとの 100 ng のライブラリー収量に達する PCR サイクル数の目安である。

表 1：100 ng のライブラリー収量に必要な PCR サイクル数

インプット DNA 量	> 100 ng のライブラリー収量に必要な PCR サイクル数 (30 μ l のクリーンアップ済ライブラリーにおいて、> 15 nM となる)
200 ng	3 ~ 4
100 ng	4 ~ 5
50 ng	5 ~ 6
10 ng	8 ~ 9

表 2 は、ターゲットエンリッチメントのための、インプット量ごとの 1 μ g のライブラリー収量に達する PCR サイクル数の目安である。10 ng はターゲットエンリッチメントには推奨されない。PCR サイクル数が多い場合には、アダプターダイマーを避けるため、アダプターの希釈が推奨される。

表 2：1 μ g のライブラリー収量に必要なアダプター希釈倍率と PCR サイクル数

インプット DNA 量	NEBNext Adaptor for Illumina の希釈	約 1 μ g のライブラリー収量のために必要な PCR サイクル数 (30 μ l のクリーンアップ済ライブラリーにおいて、> 150 nM となる)
200 ng	希釈なし	7 ~ 8
100 ng	希釈なし	8 ~ 9
50 ng	5X 希釈	10 ~ 12

キットの構成

NEB #E3325S 構成表

NEB #	製品	液量
E3324A	NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer	0.056 ml
E3326A	NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix	0.024 ml
E3327A	NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix	0.24 ml
E3328A	NEBNext MSTC High Yield Master Mix	0.96 ml
E3339A	NEBNext Bead Reconstitution Buffer	0.96 ml
E3341A	0.1X TE	2.4 ml

NEB #E3325L 構成表

NEB #	製品	液量
E3324AA	NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer	0.224 ml
E3326AA	NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix	0.096 ml
E3327AA	NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix	0.96 ml
E3328AA	NEBNext MSTC High Yield Master Mix	3.9 ml
E3339AA	NEBNext Bead Reconstitution Buffer	3.9 ml
E3341AA	0.1X TE	9.6 ml

改訂履歴：

改訂番号	内容	日付
1.0	N/A	9/23
1.1	Step 4.1 (4 ページ) の保存に関する情報を削除	10/23
2.0	キットの他に別途準備が必要なものに記載されている、インデックスプライマーの内容を修正	9/25



This product is intended for research purposes only. This product is not intended to be used for therapeutic or diagnostic purposes in humans or animals.

This product is covered by one or more patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc. For more information about commercial rights, please email us at busdev@neb.com. While NEB develops and validates its products for various applications, the use of this product may require the buyer to obtain additional third party intellectual property rights for certain applications.

This product is licensed for research and commercial use from Bio-Rad Laboratories, Inc., under U.S. Pat. Nos. 6,627,424, 7,541,170, 7,670,808, 7,666,645, and corresponding patents in other countries. No rights are granted for use of the product for Digital PCR or real-time PCR applications, with the exception of quantification in Next Generation Sequencing workflows.

NEW ENGLAND BIOLABS®, NEB®, NEBNext®, NEBNext UltraExpress™, USER® は、New England Biolabs, Inc. の商標または登録商標です。

ILLUMINA® is a registered trademarks of Illumina, Inc. AGILENT®, BIOANALYZER® and SCREENTAPE® are registered trademark of Agilent Technologies, Inc.

COVARIS® is a registered trademark of Covaris, Inc. BECKMAN COULTER® is a registered trademarks of Beckman Coulter, Inc.

EPPENDORF® and LOBIND® are a registered trademark of Eppendorf AG. THERMO SCIENTIFIC™ and NANODROP™ are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

© Copyright 2026, New England Biolabs, Inc.; all rights reserved.

ご質問は弊社テクニカルサポート (Tel: 03-4545-1420、E-mail: tech.jp@neb.com) までお問い合わせください。



ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社

〒130-0022 東京都墨田区江東橋 2-2-3

カスタマーサービス TEL : 03-4545-1421 FAX : 03-5669-6194

テクニカルサポート TEL : 03-4545-1420 Email : tech.jp@neb.com

ウェブサイト : www.neb.com

