

NEBNext UltraExpress™ RNA Library Prep Kit

NEB #E3330S/L

24/96 reactions

英語版マニュアル Version 4.0 10/25 に対応

目次：

| | |
|--|----|
| キットの他に別途準備が必要なもの | 2 |
| RNA-seq ライブラリー調製の前処理キットの選び方 | 3 |
| 概要 | 3 |
| プロトコール | |
| Section 1A : Express プロトコール (mRNA 精製) | |
| NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490) | |
| NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330) | |
| NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) | 4 |
| Section 1B : Standard プロトコール (mRNA 精製) | |
| NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490) | |
| NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330) | |
| NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) | 13 |
| Section 2 : プロトコール (rRNA 除去) | |
| NEBNext rRNA Depletion Kits (NEB #E7405, #E7400, #E7860, #E7850, #E7755, #E7750) | |
| NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330) | |
| NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) | 22 |
| Appendix A : アダプター希釈と PCR サイクル数のカスタム | 31 |
| Appendix B : NEBNext Unique Dual Index UMI Adaptor for Illumina を使用するプロトコール | 32 |
| Appendix C : FFPE RNA のプロトコール | 33 |
| Appendix D : 長い RNA インサートのための断片化プロトコール | 34 |
| キット構成 | 35 |
| 改定履歴 | 36 |

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 4.0 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/e3330nebnext-express-rna-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 #E3330S) および 96 反応 (NEB #E3330L) の調製に十分な液量の試薬が含まれている。

Package 1：-20°Cで保存

- (藤色) NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix
- (藤色) NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix
- (茶色) NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent
- (橙色) NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix
- (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 UltraExpress USER® Enzyme
- (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix
- (白色) NEBNext Adaptor Dilution Buffer
- (白色) 0.1X TE
- (白色) ヌクレアーゼフリー水
- (白色) NEBNext Bead Reconstitution Buffer

キットの他に別途準備が必要なもの：

- NEBNext Multiplex Oligos for Illumina®
NEBNext Multiplex Oligos の詳細は 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)
- 80%エタノール (用事調製)
- サーマルサイクラー
- 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)
- ボルテックス
- Agilent® Bioanalyzer® や TapeStation などの DNA/RNA 定性解析装置およびチップ
- マイクロ遠心機

NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490) との併用時に必要なもの：

- 1.5 ml 遠心チューブおよびマグネットスタンド (参考製品 NEB #S1506、ビーズの洗浄で使用)

NEBNext Ribosomal Depletion Kits との併用時に必要なもの：

- NEB #E7405、#E7860、#E7755 は RNA 用の核酸精製ビーズがキットに付属
- NEB #E7400、#E7850、#E7750 は RNA 用の核酸精製ビーズがキットに付属しない
 - Agencourt RNAClean XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63987)

アダプタートリミング用の配列：

イルミナ社用の NEBNext シリーズで作成したライブラリーは TruSeq® に類似しており、TruSeq と同じ配列をトリミングする必要がある。

Read 1 AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
Read 2 AGATCGGAAGAGCGTCGTAGGGAAAGAGTGT

poly(A) mRNA 精製と rRNA 除去の選択方法：

ライブラリー調製プロトコールは、解析対象の RNA の種類と RNA サンプルの品質に基づいて選択する。トータル RNA は主にリボソーム RNA (rRNA) で構成されており、通常は解析対象とはならない。rRNA は、2 種類ある手法のどちらかを用いて、トータル RNA から除去する。真核生物の mRNA の poly(A) tail と結合するオリゴ d(T) ピーズを使用する手法、または rRNA 特異的プローブを用いて rRNA を除去する手法がある。NEB は、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490) と、NEBNext rRNA Depletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) (NEB #E7400/#E7405)などを販売している。

オリゴ d(T) アプローチでは、poly(A) tail を持つ mRNA のみが精製される。poly(A) tail を持たない他の RNA、例えばノンコーディング RNA や poly(A) を持たない mRNA はビーズに結合しない。さらに、一部の生物(例：原核生物)由来の mRNA や分解された RNA(例：FFPE RNA)は poly(A) tail を持たないため、oligo d(T) ピーズで回収できない。一方、プローブベースの rRNA 除去キットはターゲットの rRNA を除去するものの、ノンコーディング RNA や mRNA などの生物学的に関連する他の RNA には影響を与えない。

ライブラリー調製プロトコールを決定する際には、RNA サンプルの品質も考慮する必要がある。NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module は、poly(A) tail を持つ mRNA のみを精製するため、高品質の RNA サンプル (RIN > 7) を使用する必要がある。部分的に分解されたサンプルや、高度に分解されたサンプル(例えば、RIN ≤ 7、FFPE RNA)には、NEBNext rRNA Depletion Kit を使用すること。

概要：

NEBNext UltraExpress RNA 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が含まれている。NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit は、25 ~ 250 ng のトータル RNA 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。標準プロトコールのほか、ライブラリーの収量の最適化のためのカスタムプロトコールも記載されている。なお、mRNA 精製 / rRNA 除去とライブラリー調製との間に中断が必要な場合は、製品ページの FAQ を参照すること。

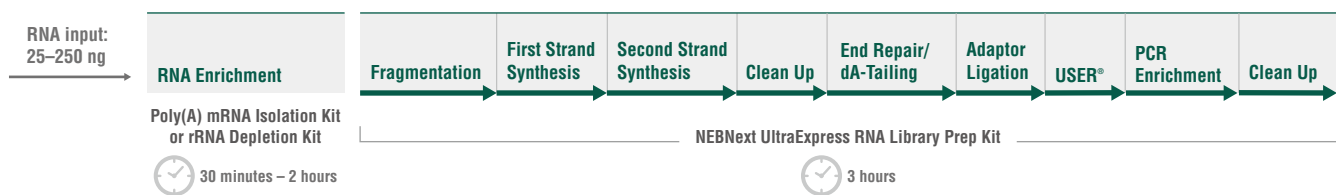
poly(A) mRNA 精製用の Express プロトコール (Section 1A) も利用可能である。大幅に高速化されたワークフローにより、短時間で標準プロトコール (Section 1B) と同等のパフォーマンスが得られる。

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。

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

図 1：NEBNext UltraExpress RNA ワークフロー



Section 1A

Express プロトコール:

NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490)、 NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330)、 NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) を併用

記号



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 RNA 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。

本プロトコールは、Universal Human Reference Total RNA を使用して最適化されている。

RNA サンプルの要件

RNA の品質

RNA サンプルを Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico チップで泳動して、インプット RNA の品質を評価する。Poly (A) mRNA 精製では、RIN 値が7を超える高品質 RNA が必要である。

RNA サンプル調製のポイント

RNA サンプルには、塩類 (Mg²⁺、グアニジニウム塩など)、2価のカチオンキレート剤 (EDTA、EGTA など)、有機物 (フェノール、エタノールなど) を含まないようにする。また、RNA サンプルには DNA を含まないようにする。DNA が夾雑していてもそこからライブラリーが調製されることはほとんどないが、吸光度計で RNA 定量をした際に DNA 濃度が加算して測定されるため、PCR サイクル数が正しく設定できず、ライブラリー調製効率の低下を招くためである。特にゲノム DNA (gDNA) は、RNA 抽出時に夾雑することが多い。有機溶媒抽出での中間層を採取した場合、または固相式のシリカマトリックスでの RNA 抽出時にオーバーロードした場合に、gDNA が夾雑する可能性がある。トータル RNA サンプルに gDNA が含まれている可能性がある場合は、サンプルを DNase I (別途準備、NEB #M0303 など) で処理して gDNA を除去する。この際、DNase I が残存していた場合、mRNA 精製に使用するオリゴ dT を分解する恐れがあるので、DNase I 処理後はフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿などで除去・精製をする。

インプット量

1本鎖 RNA 特異的な定量機器 (Qubit[®] フルオロメーターなど) で定量するとよい。また Bioanalyzer で RIN > 7 であることを確認する。さらに DNA フリーであることを確認して、25 ~ 250 ng のトータル RNA を用いる。本プロトコールでは、約 200 bp のインサートサイズとなるように最適化されている。

注意: 特に明記が無い場合、すべてのバッファーを氷上に置いておくこと。

mRNA 精製開始前の準備

以下の試薬を -20°C 冷凍庫から取り出し、氷上で融解させること。

- NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix
- NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix (注意: ボルテックス禁止、転倒混和により混ぜること)

1A.1. 1X Fragmentation Mix の準備

1A.1.1. Fragmentation Master Mix を溶かし、以下の手順で 1X の溶液を調製する。

| 試薬 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| ● (藤色) NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix | 4 µl |
| ヌクレアーゼフリー水 | 4 µl |

注意: mRNA 精製後の使用時まで、本ミックスを氷上で保管すること。ステップ 1A.2.26. で使用する。

1A.2. トータル RNA からの mRNA 精製、断片化およびプライミング

- 1A.2.1. トータル RNA をヌクレアーゼフリー水で希釈し、0.2 ml のヌクレアーゼフリー PCR チューブ内で最終容量を 50 μ l とし、氷上で保管する。
- 1A.2.2. 1.5 ml チューブに 1 サンプルあたり 20 μ l の NEBNext Oligo dT25 beads を加える。ビーズをフリッキングと転倒混和にて混ぜること。ボルテックスはしないこと。複数のライブラリーを調製する場合、最大 24 サンプル用のビーズを 1 本の 1.5 ml チューブに加えてまとめて洗浄できる (1.5 ml のチューブには専用のマグネットラック: NEB #S1506 などを使用すること)。本ステップでビーズのパッファーを Storage Buffer から Binding Buffer に置換する。2X Binding Buffer を事前に希釈する必要はない。
- 1A.2.3. チューブをマグネットラック上に設置し、溶液が透明になるまで室温で 2 分間インキュベーションする。
- 1A.2.4. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1A.2.5. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1A.2.6. NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l をビーズに添加し、ピペッティングを 6 回行って洗浄する。複数のライブラリーを調製する場合には、1 サンプルあたり RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l を添加する。NEBNext RNA Binding Buffer (2X) を希釈する必要はない。
- 1A.2.7. チューブをマグネットラック上に設置し、溶液が透明になるまで室温でインキュベーションする (約 2 分間)。
- 1A.2.8. 上清を廃棄する。完全に上清を取り除く必要があるが、ビーズには触れないように注意する。
- 1A.2.9. NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l をビーズに添加し、ビーズが均一になるまでピペッティングを行って混合する。複数のライブラリーを調製する場合には、1 サンプルあたり NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l を添加する。NEBNext RNA Binding Buffer (2X) を希釈する必要はない。
- 1A.2.10. ステップ 1A.2.1. で調製した各 RNA サンプルにビーズ 50 μ l を添加する。ピペッティングを 6 回行って、ビーズを十分に混合する。1 回目の結合ステップにより、ある程度の Non-target RNA が除去される (完全には除去されない)。
- 1A.2.11. サンプルを加熱し、RNA を変性させることで poly (A) mRNA がビーズに結合するようにする。Heat lid を 90°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。
- 80°C、2 分
25°C、5 分
25°C、保持
- 1A.2.12. 25°C の保持ステップに達したら、チューブをサーマルサイクラーから取り出す。
- 1A.2.13. 溶液が透明になるまでマグネットラックにチューブを 2 分間静置する。
- 1A.2.14. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。マグネットラックからチューブを外さないこと。
- 1A.2.15. マグネットラックに設置したままの状態、穏やかに 200 μ l の NEBNext Wash Buffer を加えて、ビーズに結合していない RNA を除去する。
- 1A.2.16. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1A.2.17. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1A.2.18. poly (A) mRNA が同じビーズに再結合するために、下記の試薬をチューブに加える。穏やかに 6 回ピペッティングし、ビーズを十分に混合する。

| 試薬 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---------------------------------|--------------|
| NEBNext Tris Buffer | 50 μ l |
| NEBNext RNA Binding Buffer (2X) | 50 μ l |
| 全液量 | 100 μ l |

複数のサンプルの場合には、マスターミックスを準備しておいても良い。サンプルに加える前は氷上にて保管すること。

- 1A.2.19. Heat lid を 90°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。チューブのキャップをしっかりと締めること。
- 80°C、2 分
25°C、5 分
25°C、保持
- 1A.2.20. 25°C の保持ステップに達したら、チューブをサーマルサイクラーから取り出す。
- 1A.2.21. 溶液が透明になるまで、マグネットラックにチューブを 2 分間静置する。
- 1A.2.22. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。マグネットラックからチューブを外さないこと。

- 1A.2.23. マグネットラックに設置したままの状態、穏やかに 200 μ l の NEBNext Wash Buffer を加えて、ビーズに結合していない RNA を除去する。
- 1A.2.24. 上清を廃棄する。NEBNext Wash Buffer が残らないように、完全に廃棄すること。また、mRNA が結合しているビーズを触らないこと。
注意：後のステップで mRNA の断片化を成功させるためには、上清を完全に破棄することが重要である。チューブをスピンドウン、マグネットラックに設置し、10 μ l のピペットチップを使用して上清の洗浄バッファーを完全に除去する（注意：mRNA を含むビーズには触れないように注意する）。この間、ビーズが乾燥しないようにすること。
- 1A.2.25. チューブをマグネットラックから除去する。
注意：以降には 200 nt の RNA 断片化方法を記す。200 nt より大きい RNA インサートを調製したい場合、Appendix D を参照すること。
- 1A.2.26. ステップ 1A.1.1. で調製した 1X Fragmentation Master Mix を 6.5 μ l 添加し、6 回ピペッティングしてビーズを再懸濁する。ここでビーズから mRNA が最終溶出される。
- 1A.2.27. Heat lid を 105°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。
94°C、15 分
4°C、保持 *
* チューブが取り扱える温度（約 65°C）になり次第、チューブを氷上に移して 1 分間静置する。
- 1A.2.28. チューブをスピンドウン、すぐにマグネットスタンドに置き、溶液が透明になるまで静置する（約 1 ~ 2 分間）。
- 1A.2.29. 上清 5 μ l を 0.2 ml のヌクレアーゼフリー PCR チューブに移す。これが断片化 mRNA である。
注意 1：もし上清の量が 5 μ l 未満であった場合には、5 μ l となるように 1X Fragmentation Master Mix を追添加し、次のプロトコールに進むこと。
注意 2：磁気ビーズを持ち込まないこと。
- 1A.2.30. チューブを氷上に置き、第 1 鎖 cDNA 合成に進む。

1A.3. 第1鎖 cDNA 合成

1A.3.1. ステップ 1A.2.30. で断片化とプライミングした RNA に以下の試薬を氷上で添加する。

| 第1鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 断片化、プライミング済 RNA (ステップ 1A.2.30.) | 5 μ l |
| ● (茶色) NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent | 4 μ l |
| ○ (藤色) NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix | 1 μ l |
| 全液量 | 10 μ l |

1A.3.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。

1A.3.3. 10 回以上ピペティングして十分に混合する。

1A.3.4. Heat lid を 80°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。

25°C、10 分

42°C、10 分

70°C、5 分

4°C、保持

すぐに第2鎖 cDNA 合成に進む。

1A.4. 第2鎖 cDNA の合成

1A.4.1. NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix を氷上で溶かし、転倒混和にて 10 回攪拌する。スピンドウンして氷上に戻す。ステップ 1A.3.4. で調製した第1鎖 cDNA 合成産物に以下の試薬を氷上で添加し、第2鎖 cDNA 合成反応を行う。

| 第2鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第1鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 1A.3.4.) | 10 μ l |
| ● (橙色) NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix | 30 μ l |
| 全液量 | 40 μ l |

1A.4.2. チューブを氷上に置いたままで、10 回以上ピペティングして十分に混合する。

1A.4.3. Heat lid を 40°C 以下 (またはオフ) 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。

16°C、30 分

4°C、保持

1A.5. 2本鎖 cDNA の精製

注意：AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

- 1A.5.1. 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、再懸濁をしてから使用する。
- 1A.5.2. 再懸濁したビーズ 72 μ l (1.8X) を第 2 鎖 cDNA 合成反応産物 (約 40 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして完全に混合すること。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。
- 1A.5.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1A.5.4. チューブをスピンドウンした後、マグネットラック上に設置する。溶液が透明 (約 5 分間) になったら、上清を注意深く破棄する。ビーズには cDNA が結合しているため、触れないように注意する (注意：ビーズは捨てないこと)。
- 1A.5.5. マグネットスタンド内にチューブを設置したまま、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、上清を注意深く破棄する。
- 1A.5.6. ステップ 1A.5.5. 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。
- 1A.5.7. マグネットスタンド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。

- 1A.5.8. チューブをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 22 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。
- 1A.5.9. ボルテックスミキサーまたはピペティング (10 回以上) で十分に混合する。必要に応じてチューブをスピンドウンし、室温で 2 分間インキュベーションする。
- 1A.5.10. チューブ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。ビーズに触れないよう上清の 20 μ l を新しいヌクレアーゼフリー PCR チューブに移す。



注意：一時中断可能。サンプルは -20°C で一晩保存可能である。

1A.6. cDNA ライブラリーのエンドプレップ (末端処理)

- 1A.6.1. ステップ 1A.5.10. の第 2 鎖合成産物に以下の試薬を添加する。

| エンドプレップ反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第 2 鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 1A.5.10.) | 20 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer | 2.5 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix | 1.5 μ l |

- 1A.6.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。
- 1A.6.3. 20 μ l または 100 μ l のピペットを 20 μ l にセットし、10 回以上ピペティングして完全に混合する。スピンドウンして全溶液をチューブの底に落とす。

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。

- 1A.6.4. 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 、5 分

65°C 、10 分

4°C 、保持

すぐにアダプターライゲーションに進む。

1A.7. アダプターライゲーション

1A.7.1. ライゲーション反応を実施する前に●（赤色）NEBNext Adaptor* を氷冷した Adaptor Dilution Buffer で希釈する。希釈した NEBNext Adaptor は氷上に置いておく。

| トータル RNA インプット量 | 希釈率 |
|-----------------|----------------------------------|
| 25 ~ 250 ng | Adaptor Dilution Buffer で 50 倍希釈 |

* NEBNext アダプターは、別売の NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E6609、#E7600、#E7780、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448) に含まれる。

注意：インプット量ごとにアダプターの濃度を最適化する場合は、Appendix A の表 1 を参照すること。

1A.7.2. ステップ 1A.6.4. のエンドプレップ反応液に下記の試薬を氷上にて追添加する。

| アダプターライゲーション反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| エンドプレップ反応液 (ステップ 1A.6.4.) | 24 µl |
| 希釈アダプター (ステップ 1A.7.1.) | 2 µl |
| ●（赤色）NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix | 12 µl |
| 全液量 | 38 µl |

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

1A.7.3. 100 µl のピペットを 35 µl にセットし、10 回以上ピペッ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。

1A.7.4. Heat lid を 40°C 以下（またはオフ）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

4°C、保持

1A.7.5. ステップ 1A.7.4. の反応物に●（青色）の NEBNext UltraExpress USER Enzyme 2 µl を追添加する。Total volume は 40 µl になる。35 µl にセットしたピペットでゆっくりと 10 回混合する。

1A.7.6. Heat lid を 45°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

すぐにアダプター付加 DNA の PCR 増幅に進む。

1A.8. 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、1A.8.1A. 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、1A.8.1B. に従う。
各プライマー濃度は 5 µM、合計で 10 µM である。

1A.8.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、1A.8.1A. または 1A.8.1B. を選択する。ステップ 1A.7.6. のアダプター付加 DNA に以下の構成成分を添加する。

1A.8.1A. 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 1A.7.6.) | 40 µl |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 µl |
| Index (X) Primer/i7 Primer** ** | 5 µl |
| Universal PCR Primer/i5 Primer** ** | 5 µl |
| 全液量 | 100 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。

1A.8.1B. 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 1A.7.6.) | 40 µl |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 µl |
| Index Primer Mix* | 10 µl |
| 全液量 | 100 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。

1A.8.2. 100 µl または 200 µl のピペットを 90 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。

1A.8.3. 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。表 1A.8.3A を参照。

表 1A.8.3A :

| 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 | 12** |
| 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 | ∞ | |

** 上記の PCR サイクル数は、高品質の Universal Human Reference Total RNA を用いた場合のサイクル数になる。サンプルの品質に応じて PCR サイクル数の最適化が必要な場合がある。サイクル数の最適化するには、Appendix A の表 3.2.1 を参照すること。

注意 : 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。

1A.9. 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、必ず本プロトコールの比率に従い、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。

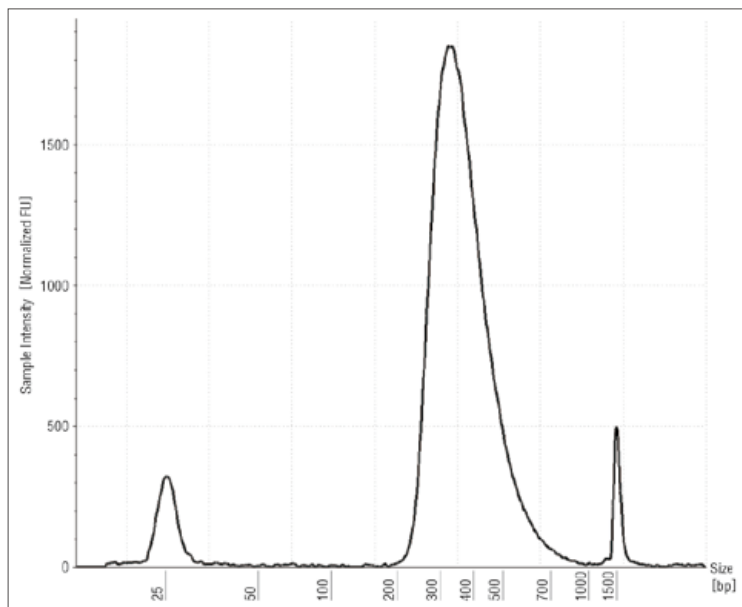
- 1A.9.1. SPRIselect Beads または NEBNext Sample Purification Beads をボルテックスして再懸濁する。懸濁が不十分な場合、DNA 回収量が低下するため、十分に注意する。AMPure XP Beads を使用する場合、懸濁して 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁してから使用する。
- 1A.9.2. 再懸濁したビーズ 70 μ l (0.7 X) を PCR 反応産物 (~ 100 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。最後のピペティングの際には、チップ内の液体をすべて排出するよう注意すること。3 ~ 5 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。
- 1A.9.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1A.9.4. 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。
- 1A.9.5. 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)。
- 1A.9.6. 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。
- 1A.9.7. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1A.9.8. 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。
- 1A.9.9. 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)。
- 1A.9.10. 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。
- 1A.9.11. ステップ 1A.9.10. 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。
- 1A.9.12. マグネットスタンド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。
- 1A.9.13. 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 23 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。
- 1A.9.14. 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。
- 1A.9.15. 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 20 μ l を新しい PCR チューブに移し、-20°C で保存する。

1A.10. Agilent Bioanalyzer DNA Chip または TapeStation でのライブラリー品質評価

- 1A.10.1. DNA 1000 chip を用いてライブラリー 1 μ l を泳動する。ライブラリーの収量が非常に少ない場合は、DNA High Sensitivity chip を用いて泳動する。その場合は、必要に応じてライブラリーを希釈してから泳動する。
- 1A.10.2. 電気泳動図でライブラリーが約 300 bp のピークサイズを示していることを確認する。

注意：～80 bp (プライマー) または 150 bp (アダプターダイマー) のピークが Bioanalyzer トレースに表示される場合は、0.1X TE バッファーでサンプル (ステップ 1A.9.15.) を 50 μ l にし、45 μ l (0.9X) の SPRIselect Bead または NEBNext Sample Purification Bead で通常のビーズクリーンアップを実施すること。

図 1A.10.2.1：250 μ g のヒトリファレンス RNA からのライブラリーのサイズ分布の例



Section 1B

Standard プロトコール:

NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490)、 NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330)、 NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) を併用

記号



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 RNA 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。

本プロトコールは、Universal Human Reference Total RNA を使用して最適化されている。

RNA サンプルの要件

RNA の品質

RNA サンプルを Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico チップで泳動して、インプット RNA の品質を評価する。Poly (A) mRNA 精製では、RIN 値が7を超える高品質 RNA が必要である。

RNA サンプル調製のポイント

RNA サンプルには、塩類 (Mg²⁺、グアニジニウム塩など)、2 価のカチオンキレート剤 (EDTA、EGTA など)、有機物 (フェノール、エタノールなど) を含まないようにする。また、RNA サンプルには DNA を含まないようにする。DNA が夾雑していてもそこからライブラリーが調製されることはほとんどないが、吸光度計で RNA 定量をした際に DNA 濃度が加算して測定されるため、PCR サイクル数が正しく設定できず、ライブラリー調製効率の低下を招くためである。特にゲノム DNA (gDNA) は、RNA 抽出時に夾雑することが多い。有機溶媒抽出での中間層を採取した場合、または固相式のシリカマトリックスでの RNA 抽出時にオーバーロードした場合に、gDNA が夾雑する可能性がある。トータル RNA サンプルに gDNA が含まれている可能性がある場合は、サンプルを DNase I (別途準備、NEB #M0303 など) で処理して gDNA を除去する。この際、DNase I が残存していた場合、mRNA 精製に使用するオリゴ dT を分解する恐れがあるので、DNase I 処理後はフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿などで除去・精製をする。

インプット量

1 本鎖 RNA 特異的な定量機器 (Qubit フルオロメーターなど) で定量するとよい。また Bioanalyzer で RIN > 7 であることを確認する。さらに DNA フリーであることを確認して、25 ~ 250 ng のトータル RNA を用いる。本プロトコールでは、約 200 bp のインサートサイズとなるように最適化されている。

注意: 特に明記が無い場合、すべてのバッファーを氷上に置いておくこと。

mRNA 精製開始前の準備

以下の試薬を -20°C 冷凍庫から取り出し、氷上で融解させること。

- NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix
- NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix (注意: ボルテックス禁止、転倒混和により混ぜること)

1B.1. 1X Fragmentation Mix の準備

1B.1.1. Fragmentation Master Mix を溶かし、以下の手順で 1X の溶液を調製する。

| 試薬 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| ● (藤色) NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix | 4 µl |
| ヌクレアーゼフリー水 | 4 µl |

注意: mRNA 精製後の使用時まで、本ミックスを氷上で保管すること。ステップ 1B.2.36. で使用する。

1B.2. トータル RNA からの mRNA 精製、断片化およびプライミング

- 1B.2.1. トータル RNA をヌクレアーゼフリー水で希釈し、0.2 ml のヌクレアーゼフリー PCR チューブ内で最終容量を 50 μ l とし、氷上で保管する。
- 1B.2.2. 1.5 ml のヌクレアーゼフリーチューブ中、以下試薬でオリゴ dT ビーズを洗浄する。複数のライブラリーを調製する場合、最大 10 サンプル用のビーズを 1 本の 1.5 ml チューブに加えてまとめて洗浄できる (1.5 ml のチューブには専用のマグネットスタンド: NEB #S1506 などを使用する)。本ステップでビーズのバッファーを Storage Buffer から Binding Buffer に置換する。2X Binding Buffer を事前に希釈する必要はない。

注意: 使用前にすべてのバッファーをボルテックスし混合すること。ただし、RNA やビーズはボルテックスにより混合しないこと。ビーズは、使用する前にチューブをフリッキングするか、転倒混和によりよく混合し、均一な懸濁液にすること。

| 試薬 | 1 サンプルあたりの液量 |
|------------------------------------|--------------|
| Oligo dT Beads d (T) ₂₅ | 20 μ l |
| NEBNext RNA Binding Buffer (2X) | 100 μ l |
| 全液量 | 120 μ l |

- 1B.2.3. ピペッティングを 6 回行ってビーズを洗浄する。
- 1B.2.4. チューブをマグネットラック上に設置し、溶液が透明になるまで室温で 2 分間インキュベーションする。
- 1B.2.5. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1B.2.6. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1B.2.7. NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 100 μ l をビーズに添加し、ピペッティングを 6 回行って洗浄する。複数のライブラリーを調製する場合には、1 サンプルあたり RNA Binding Buffer (2X) 100 μ l を添加する。NEBNext RNA Binding Buffer (2X) を希釈する必要はない。
- 1B.2.8. チューブをマグネットラック上に設置し、溶液が透明になるまで室温でインキュベーションする (約 2 分間)。
- 1B.2.9. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1B.2.10. NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l をビーズに添加し、ビーズが均一になるまでピペッティングを行って混合する。複数のライブラリーを調製する場合には、1 サンプルあたり NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l を添加する。
- 1B.2.11. ステップ 1B.2.1. で調製した各 RNA サンプルにビーズ 50 μ l を添加する。ピペッティングを 6 回行って、ビーズを十分に混合する。1 回目の結合ステップにより、ある程度の Non-target RNA が除去される (完全には除去されない)。
- 1B.2.12. サンプルを加熱し、RNA を変性させることで mRNA がビーズに結合するようにする。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。
- 65°C、5 分
4°C、保持
- 1B.2.13. 温度が 4°C に達したら、チューブをサーマルサイクラーから取り出す。
- 1B.2.14. ピペッティングを 6 回行って、ビーズを十分に混合する。チューブを実験台に置き、mRNA がビーズに結合できるように室温で 5 分間インキュベーションする。
- 1B.2.15. 溶液が透明になるまでマグネットラックにチューブを静置する (約 2 分間)。
- 1B.2.16. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1B.2.17. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1B.2.18. チューブに Wash Buffer 200 μ l を添加、穏やかに 6 回ピペッティングして十分に混合する。ここでビーズを洗浄し、ビーズに結合していない RNA を除去する。
- 1B.2.19. 溶液が透明になるまでマグネットラックにチューブを静置する (約 2 分間)。
- 1B.2.20. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1B.2.21. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1B.2.22. ステップ 1B.2.18. ~ 1B.2.21. を 1 回繰り返す。

- 1B.2.23. 各チューブに 50 μ l の Tris Buffer (NEB #E7490 に付属) を添加する。穏やかに 6 回ピペティングし、ビーズを十分に混合する。
- 1B.2.24. ビーズからの 1 回目の mRNA の溶出のため、Heat lid を 90°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。
- 80°C、2 分
- 25°C、保持
- 1B.2.25. 25°C の保持ステップに達したら、チューブをサーマルサイクラーから取り出す。
- 1B.2.26. サンプルに NEBNext RNA Binding Buffer (2X) 50 μ l を加え、mRNA をビーズに再結合させる。ピペティングを穏やかに 6 回行って、ビーズを十分に混合する。
- 1B.2.27. チューブを室温で 5 分間インキュベーションする。
- 1B.2.28. 溶液が透明になるまでマグネットラックにチューブを静置する (約 2 分間)。
- 1B.2.29. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 1B.2.30. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 1B.2.31. Wash Buffer 200 μ l を加えてビーズを洗浄する。穏やかに 6 回ピペティングし、十分に混合する。
- 1B.2.32. チューブをスピンドウンする。
- 注意：Wash Buffer を後のステップに持ち越さないように、チューブをスピンドウンすることが重要である。**
- 1B.2.33. 溶液が透明になるまでマグネットスタンドにチューブを静置する (約 2 分間)。
- 1B.2.34. 上清を廃棄する。ビーズには触れないように注意する。
- 注意：後のステップで mRNA の断片化を成功させるためには、上清を完全に破棄することが重要である。チューブをスピンドウン、マグネットラックに設置し、10 μ l のピペットチップを使用して上清の洗浄バッファーを完全に除去する (注意：mRNA を含むビーズには触れないように注意する)。この間、ビーズが乾燥しないようにすること。**
- 1B.2.35. チューブをマグネットラックから取り出す。
- 注意：以降には 200 nt の RNA 断片化方法を記す。200 nt より大きい RNA インサートを調製したい場合、Appendix D を参照する。**
- 1B.2.36. ステップ 1B.1.1. で調製した 1X Fragmentation Master Mix を 6.5 μ l 添加し、6 回ピペティングしてビーズを再懸濁する。ここでビーズから mRNA が最終溶出される。
- 1B.2.37. サーマルサイクラーの Heat lid を 105°C に設定、以下のプログラムを実行する。
- 94°C、15 分
- 4°C、保持 *
- * チューブが取り扱える温度 (約 65°C) になり次第、チューブを氷上に移して 1 分間静置する。
- 1B.2.38. チューブをスピンドウン、すぐにマグネットスタンドに置き、溶液が透明になるまで静置する (約 1 ~ 2 分間)。
- 1B.2.39. 上清 5 μ l を 0.2 ml のヌクレアーゼフリー PCR チューブに移す。これが断片化 mRNA である。
- 注意 1：回収した上清の容量が 5 μ l 未満である場合には、5 μ l になるように 1X Fragmentation Master Mix を添加し、次のプロトコールに進むこと。**
- 注意 2：磁気ビーズを持ち込まないこと。**
- 1B.2.40. チューブを氷上に置き、第 1 鎖 cDNA 合成に進む。

1B.3. 第1鎖 cDNA 合成

1B.3.1. ステップ 1B.2.40. で断片化とプライミングした RNA に以下の試薬を氷上で添加する。

| 第1鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 断片化、プライミング済 RNA (ステップ 1B.2.40.) | 5 µl |
| ● (茶色) NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent | 4 µl |
| ○ (藤色) NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix | 1 µl |
| 全液量 | 10 µl |

1B.3.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。

1B.3.3. 10 回以上ピペティングして十分に混合する。

1B.3.4. Heat lid を 80°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。

25°C、10 分

42°C、10 分

70°C、5 分

4°C、保持

すぐに第2鎖 cDNA 合成に進む。

1B.4. 第2鎖 cDNA の合成

1B.4.1. NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix を氷上で溶かし、転倒混和にて10回攪拌する。スピンドウンして氷上に戻す。ステップ 1B.3.4. で調製した第1鎖 cDNA 合成産物に以下の試薬を氷上で添加し、第2鎖 cDNA 合成反応を行う。

| 第2鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第1鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 1B.3.4.) | 10 µl |
| ● (橙色) NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix | 30 µl |
| 全液量 | 40 µl |

1B.4.2. チューブを氷上に置いたままで、10 回以上ピペティングして十分に混合する。

1B.4.3. Heat lid を 40°C 以下 (またはオフ) 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。

16°C、30 分

4°C、保持

1B.5. 2本鎖 cDNA の精製

注意：AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

- 1B.5.1. 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。
- 1B.5.2. 再懸濁したビーズ 72 μ l (1.8X) を第 2 鎖 cDNA 合成反応産物 (約 40 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして完全に混合すること。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。
- 1B.5.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1B.5.4. チューブをスピンドウンした後、マグネットラック上に設置する。溶液が透明 (約 5 分間) になったら、上清を注意深く破棄する。ビーズには cDNA が結合しているため、触れないように注意する (注意：ビーズは捨てないこと)。
- 1B.5.5. マグネットスタンド内にチューブを設置したまま、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、上清を注意深く破棄する。
- 1B.5.6. ステップ 1B.5.5. 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。
- 1B.5.7. マグネットスタンド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。
- 1B.5.8. チューブをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 22 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。
- 1B.5.9. ボルテックスミキサーまたはピペティング (10 回以上) で十分に混合する。必要に応じてチューブをスピンドウンし、室温で 2 分間インキュベーションする。
- 1B.5.10. チューブ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。ビーズに触れないよう上清の 20 μ l を新しいヌクレアーゼフリー PCR チューブに移す。



注意：一時中断可能。サンプルは -20°C で一晩保存可能である。

1B.6. cDNA ライブラリーのエンドプレップ (末端処理)

- 1B.6.1. ステップ 1B.5.10. の第 2 鎖合成産物に以下の試薬を添加する。

| エンドプレップ反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第 2 鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 1B.5.10.) | 20 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer | 2.5 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix | 1.5 μ l |

- 1B.6.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。
- 1B.6.3. 20 μ l または 100 μ l のピペットを 20 μ l にセットし、10 回以上ピペティングして完全に混合する。スピンドウンして全溶液をチューブの底に落とす。
- 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。
- 1B.6.4. 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 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分
- 65 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分
- 4 $^{\circ}\text{C}$ 、保持
- 1B.6.5. すぐにアダプターライゲーションに進む。

1B.7. アダプターライゲーション

- 1B.7.1. ライゲーション反応を実施する前に●（赤色）NEBNext Adaptor* を氷冷した Adaptor Dilution Buffer で希釈する。希釈した NEBNext Adaptor は氷上に置いておく。

| トータル RNA インプット量 | 希釈率 |
|-----------------|----------------------------------|
| 25 ~ 250 ng | Adaptor Dilution Buffer で 50 倍希釈 |

* NEBNext アダプターは、別売の NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E6609、#E7600、#E7780、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448) に含まれる。

注意：インプット量ごとにアダプターの濃度を最適化する場合は、Appendix A の表 3.1.1 を参照すること。

- 1B.7.2. ステップ 1B.6.4. のエンドプレップ反応液に下記の試薬を氷上にて追添加する。

| アダプターライゲーション反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| エンドプレップ反応液 (ステップ 1B.6.4.) | 24 µl |
| 希釈アダプター (ステップ 1B.7.1.) | 2 µl |
| ●（赤色）NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix | 12 µl |
| 全液量 | 38 µl |

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

- 1B.7.3. 100 µl のピペットを 35 µl にセットし、10 回以上ピペッ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。

- 1B.7.4. Heat lid を 40°C 以下（またはオフ）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

4°C、保持

- 1B.7.5. ステップ 1B.7.4. の反応物に●（青色）の NEBNext UltraExpress USER Enzyme 2 µl を追添加する。Total volume は 40 µl になる。35 µl にセットしたピペットでゆっくりと 10 回混合する。

- 1B.7.6. Heat lid を 45°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

すぐにアダプター付加 DNA の PCR 増幅に進む。

1B.8. 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、1B.8.1A. に従う。
各プライマーの濃度は 10 μ M 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、1B.8.1B. に従う。
各プライマー濃度は 5 μ M、合計で 10 μ M である。

1B.8.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、1B.8.1A. または 1B.8.1B. を選択する。ステップ 1B.7.6. のアダプター付加 DNA に以下の構成成分を添加する。

1B.8.1A. 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 1B.7.6.) | 40 μ l |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 μ l |
| Index (X) Primer/i7 Primer** ** | 5 μ l |
| Universal PCR Primer/i5 Primer** ** | 5 μ l |
| 全液量 | 100 μ l |

* 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。

1B.8.1B. 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 1B.7.6.) | 40 μ l |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 μ l |
| Index Primer Mix* | 10 μ l |
| 全液量 | 100 μ l |

* 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。

1B.8.2. 100 μ l または 200 μ l のピペットを 90 μ l 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。

1B.8.3. 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。表 1B.8.3A を参照。

表 1B.8.3A :

| 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 | 12** |
| 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 | ∞ | |

** 上記の PCR サイクル数は、高品質の Universal Human Reference Total RNA を用いた場合のサイクル数になる。サンプルの品質に応じて PCR サイクル数の最適化が必要な場合がある。サイクル数の最適化するには、Appendix A の表 3.2.1 を参照すること。

注意 : 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。

1B.9. 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、必ず本プロトコールの比率に従い、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。

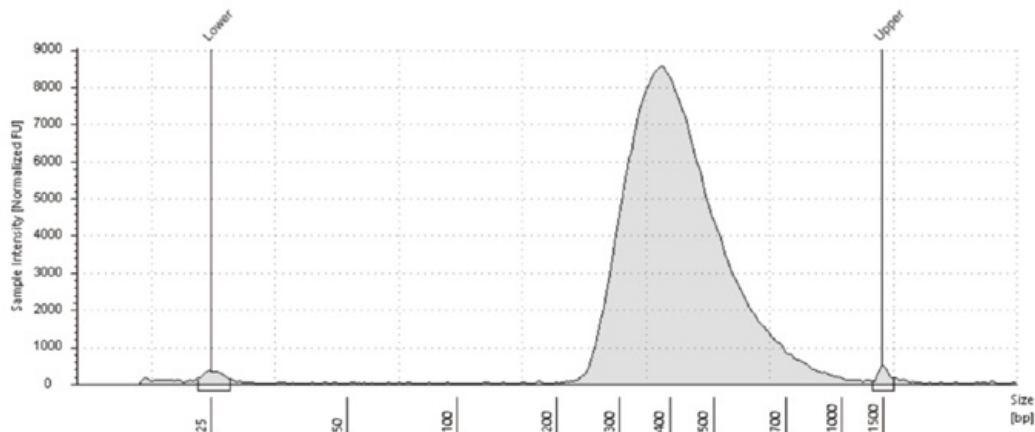
- 1B.9.1. SPRIselect Beads または NEBNext Sample Purification Beads をボルテックスして再懸濁する。懸濁が不十分な場合、DNA 回収量が低下するため、十分に注意する。AMPure XP Beads を使用する場合、懸濁して 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁してから使用する。
- 1B.9.2. 再懸濁したビーズ 70 μ l (0.7 X) を PCR 反応産物 (~ 100 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。最後のピペティングの際には、チップ内の液体をすべて排出するよう注意すること。3 ~ 5 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。
- 1B.9.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1B.9.4. 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。
- 1B.9.5. 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)。
- 1B.9.6. 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。
- 1B.9.7. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1B.9.8. 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。
- 1B.9.9. 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)。
- 1B.9.10. 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。
- 1B.9.11. ステップ 1B.9.10. 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。
- 1B.9.12. 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。
- 1B.9.13. 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 23 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。
- 1B.9.14. 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。
- 1B.9.15. 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 20 μ l を新しい PCR チューブに移し、-20°C で保存する。

1B.10. Agilent Bioanalyzer DNA Chip または TapeStation でのライブラリー品質評価

- 1B.10.1. DNA 1000 chip を用いてライブラリー 1 μ l を泳動する。ライブラリーの収量が非常に少ない場合は、DNA High Sensitivity chip を用いて泳動する。その場合は、必要に応じてライブラリーを希釈してから泳動する。
- 1B.10.2. 電気泳動図でライブラリーが約 300 bp のピークサイズを示していることを確認する。

注意： ~ 80 bp (プライマー) または 150 bp (アダプターダイマー) のピークが Bioanalyzer トレースに表示される場合は、0.1X TE バッファーでサンプル (ステップ 1B.9.15.) を 50 μ l にし、45 μ l (0.9X) の SPRIselect Bead または NEBNext Sample Purification Bead で通常のビーズクリーンアップを実施すること。

図 1B.10.2.1：250 μ g のヒトリファレンス RNA からのライブラリーのサイズ分布の例



Section 2

NEBNext rRNA Depletion Kits (NEB #E7400、#E7405、#E7850、#E7860、#E7750、#E7755)、NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit (NEB #E3330)、NEBNext Adaptor for Illumina (non-indexed) を併用したプロトコール

記号



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 RNA 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。

本プロトコールは、Universal Human Reference Total RNA を使用して最適化されている。

RNA サンプルの要件

RNA の品質

RNA サンプルを Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico チップで泳動して、インプット RNA の品質を評価する。本 Section 2 では、分解していない RNA サンプル (RIN > 7) または部分的に分解された RNA サンプル (RIN = 2 ~ 7) を対象とする。特に RIN = 2 ~ 7 の場合、表 2.5.1 を参照して断片化時間を決定する。分解が進んだ RNA サンプル (RIN = 1 ~ 2) (例: FFPE) の場合、断片化の必要はない。Appendix B に従う。

RNA サンプル調製のポイント

RNA サンプルには、塩類 (Mg²⁺、グアニジニウム塩など)、2 価のカチオンキレート剤 (EDTA、EGTA など)、有機物 (フェノール、エタノールなど) を含まないようにする。ゲノム DNA (gDNA) は、RNA 抽出時に夾雑することが多い。有機溶媒抽出での中間層を採取した場合、または固相式のシリカマトリックスでの RNA 抽出時にオーバーロードした場合に、gDNA が夾雑する可能性がある。トータル RNA サンプルに gDNA が含まれている可能性がある場合は、サンプルを DNase I (別途準備、NEB #M0303 など) で処理して gDNA を除去する。この際、DNase I が残存していた場合、rRNA 除去に使用する 1 本鎖 DNA プローブを分解する恐れがあるので、DNase I 処理後はフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿などで除去・精製をする。rRNA 除去のインプット RNA は必ずヌクレアーゼフリー水に溶かしておくこと。いくつかの DNaseI 製品、例えば TURBO DNA-free Kit は、TURBO DNase Treatment と Removal Reagent で得られる RNA の溶液がヌクレアーゼフリー水ではないため、NEBNext rRNA 除去には使用できない。

インプット量

1 本鎖 RNA 特異的な定量機器 (Qubit フルオロメーターなど) で定量するとよい。また Bioanalyzer で RIN > 7 であることを確認する。さらに DNA フリーであることを確認して、25 ~ 250 ng のトータル RNA を用いる。本プロトコールでは、約 200 bp のインサートサイズとなるように最適化されている。

注意: 特に明記が無い場合、すべてのバッファーを氷上に置いておくこと。

mRNA 精製開始前の準備

氷上で融解するために以下の試薬を取り出すこと。

- NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix
- NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix (注意: ボルテックス禁止、転倒混和により混ぜること)

2.1. 1X Fragmentation Mix の準備

2.1.1. Fragmentation Master Mix を溶かし、以下の手順で 1X の溶液を調製する。

| 試薬 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| ● (藤色) NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix | 4 µl |
| ヌクレアーゼフリー水 | 4 µl |

注意: mRNA 精製後の使用時まで、本ミックスを氷上で保管すること。ステップ 2.5.9. で使用する。

2.2. RNA へのプローブハイブリダイゼーション



NEBNext rRNA Depletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) または NEBNext rRNA Depletion Kit (Bacteria) (NEB #E7405、#E7400、#E7860、#E7850) を使用する場合は、Option A を選択すること。

NEBNext Globin & rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (NEB #E7755、#E7750) を使用する場合は、Option B を選択すること。

2.2.1A. 25 ~ 250 ng のトータル RNA をヌクレアーゼフリー水で希釈し、PCR チューブ中の最終容量を 11 μ l とする。希釈した RNA は、氷上に置いておく。

2.2.2A. 以下の手順で RNA/Probe マスターミックスを調製する。

| RNA / プローブ反応液 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| ヌクレアーゼフリー水で希釈したトータル RNA (25 ~ 250 ng) | 11 μ l |
| ○ (白色) NEBNext v2 rRNA Depletion Solution | 2 μ l |
| ○ (白色) NEBNext Probe Hybridization Buffer | 2 μ l |
| 全液量 | 15 μ l |

2.2.1B. 25 ~ 250 ng のトータル RNA をヌクレアーゼフリー水で希釈し、PCR チューブ中の最終容量を 10 μ l とする。希釈した RNA は、氷上に置いておく。

2.2.2B. 以下の手順で RNA/Probe マスターミックスを調製する。

| RNA / プローブ反応液 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| ヌクレアーゼフリー水で希釈したトータル RNA (25 ~ 250 ng) | 10 μ l |
| ○ (白色) NEBNext Globin and rRNA Depletion Solution | 3 μ l |
| ○ (白色) NEBNext Probe Hybridization Buffer | 2 μ l |
| 全液量 | 15 μ l |

2.2.3. 10 回以上ピペティングして十分に混合する。注意：ここでよく混合すること！

2.2.4. チューブをスピンドウンする。

2.2.5. Heat lid を 105°C 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。プログラム完了までの時間は 15 ~ 20 分間である。

| 温度 | 時間 |
|-------------------|---------|
| 95°C | 2 分 |
| Ramp down to 22°C | 0.1°C/秒 |
| 22°C で保持 | 5 分 |

2.2.6. チューブをスピンドウンして氷上に設置、すぐに RNase H による分解ステップに進む。

2.3. RNase H による分解

2.3.1. 以下の手順に従って、氷上で RNase H 反応液を調製する。

| RNase H 分解反応液 | 1 サンプルあたりの液量 |
|-------------------------------------|--------------|
| Hybridized RNA (ステップ 2.2.6.) | 15 µl |
| ○ (白色) RNase H Reaction Buffer | 2 µl |
| ○ (白色) NEBNext Thermostable RNase H | 2 µl |
| ヌクレアーゼフリー水 | 1 µl |
| 全液量 | 20 µl |

2.3.2. 10 回以上ピペティングして十分に混合する。

2.3.3. チューブをスピンドウンする。

2.3.4. Heat lid を 55°C (またはオン) に設定したサーマルサイクラー内でチューブを設置し、以下のプログラムを実行する。

50°C、30 分

4°C、保持

2.3.5. チューブをスピンドウンし、氷上に置く。RNA の非特異的分解を防ぐために、すぐに DNase I 分解ステップに進む。

2.4. DNase I による分解

2.4.1. 氷上でヌクレアーゼフリーチューブを用いて DNase I 反応液を調製する。

| DNase I 反応液 | 1 サンプルあたりの液量 |
|-------------------------------------|--------------|
| RNase H treated RNA (ステップ 2.3.5.) | 20 µl |
| ○ (白色) DNase I Reaction Buffer | 5 µl |
| ○ (白色) NEBNext DNase I (RNase-free) | 2.5 µl |
| ヌクレアーゼフリー水 | 22.5 µl |
| 全液量 | 50 µl |

2.4.2. 10 回以上ピペティングして十分に混合する。

2.4.3. チューブをスピンドウンする。

2.4.4. Heat lid を 45°C (またはオン) に設定したサーマルサイクラー内でチューブを設置し、以下のプログラムを実行する。

37°C、30 分

4°C、保持

2.4.5. チューブをスピンドウンし、氷上に置く。すぐに RNA 精製に進む。

2.5. Agencourt RNAClean XP Beads または NEBNext RNA Sample Purification Beads を用いた RNA 精製

2.5.1. Agencourt RNAClean XP Beads または NEBNext RNA Sample Purification Beads をボルテックスして再懸濁する。

注意：本手順では NEBNext Sample Purification Beads、SPRIselect、AMPure XP は使用できない。

2.5.2. ビーズ 90 µl (1.8X) をステップ 2.4.5. で調製した RNA サンプルに添加し、10 回以上ピペティングして十分に混合する。

2.5.3. サンプルを氷上で 15 分間インキュベーションして RNA をビーズに結合させる。

2.5.4. チューブを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。

2.5.5. 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 RNA が結合しているため、触れないように注意する。

2.5.6. マグネットスタンド内にチューブを設置したまま、80%エタノール 200 µl (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廃棄する。ビーズには RNA が結合しているため、触れないように注意する。

2.5.7. ステップ 2.5.6. をさらに 1 回繰り返し、合計 2 回の洗浄を行う。

2.5.8. チューブをスピンドウンし、マグネットスタンド上に設置する。必要に応じて、P10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。マグネットスタンド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 RNA 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。

2.5.9. チューブをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 6.5 μ l の 1X Fragmentation Master Mix (Step 2.1.1. で作成したもの) を添加して、ターゲット RNA を溶出する。ピペッティング(10 回以上)で十分に混合し、チューブをスピンドウンする。室温で 2 分間インキュベーションした後、ビーズ上での断片化に進む。

注意:以降には 200 nt の RNA 断片化方法を記す。200 nt より大きい RNA インサートを調製したい場合、Appendix D を参照すること。

2.5.10. Heat lid を 105°C 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。

94°C、15 分

4°C、保持

2.5.11. チューブをスピンドウンし、すぐにマグネットラックに設置する。溶液が透明になるまで 1~2 分程度静置する。

2.5.12. 新しいヌクレアーゼフリーの 0.2 ml PCR チューブに 5 μ l の上清を移す。

注意 1:もし上清が 5 μ l 未満しか回収できなかった場合には、5 μ l になるように 1X Fragmentation Master Mix を加えてから実験を継続すること。

注意 2:ビーズを吸い込まないこと。

2.5.13. すぐにチューブを氷上に移し、第 1 鎖 cDNA 合成に進む。

2.6. 第 1 鎖 cDNA 合成

2.6.1. ステップ 2.5.13. で断片化とプライミングした RNA に以下の試薬を氷上で添加する。

| 第 1 鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 断片化、プライミング済 RNA (ステップ 2.5.13.) | 5 μ l |
| ● (茶色) NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent | 4 μ l |
| ○ (藤色) NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix | 1 μ l |
| 全液量 | 10 μ l |

2.6.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。

2.6.3. 10 回以上ピペッティングして十分に混合する。

2.6.4. Heat lid を 80°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。

25°C、10 分

42°C、10 分

70°C、5 分

4°C、保持

すぐに第 2 鎖 cDNA 合成に進む。

2.7. 第 2 鎖 cDNA の合成

2.7.1. NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix を氷上で溶かし、転倒混和にて 10 回攪拌する。スピンドウンして氷上に戻す。ステップ 2.6.4. で調製した第 1 鎖 cDNA 合成産物に以下の試薬を氷上で添加し、第 2 鎖 cDNA 合成反応を行う。

| 第 2 鎖 cDNA 合成反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第 1 鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 2.6.4.) | 10 μ l |
| ● (橙色) NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix | 30 μ l |
| 全液量 | 40 μ l |

2.7.2. チューブを氷上に置いたままで、10 回以上ピペッティングして十分に混合する。

2.7.3. Heat lid を 40°C 以下 (またはオフ) 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。

16°C、30 分

4°C、保持

2.8. 2本鎖 cDNA の精製

注意：AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

- 2.8.1. 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。
- 2.8.2. 再懸濁したビーズ 72 μ l (1.8X) を第 2 鎖 cDNA 合成反応産物 (約 40 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして完全に混合すること。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。
- 2.8.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 2.8.4. チューブをスピンドウンした後、マグネットラック上に設置する。溶液が透明 (約 5 分間) になったら、上清を注意深く破棄する。ビーズには cDNA が結合しているため、触れないように注意する (注意：ビーズは捨てないこと)。
- 2.8.5. マグネットスタンド内にチューブを設置したまま、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、上清を注意深く破棄する。
- 2.8.6. ステップ 2.8.5. 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。
- 2.8.7. マグネットスタンド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。
- 2.8.8. チューブをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 22 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。
- 2.8.9. ボルテックスミキサーまたはピペティング (10 回以上) で十分に混合する。必要に応じてチューブをスピンドウンし、室温で 2 分間インキュベーションする。
- 2.8.10. チューブ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。ビーズに触れないよう上清の 20 μ l を新しいヌクレアーゼフリー PCR チューブに移す。



注意：一時中断可能。サンプルは -20°C で一晩保存可能である。

2.9. cDNA ライブラリーのエンドプレップ (末端処理)

- 2.9.1. ステップ 2.8.10. の第 2 鎖合成産物に以下の試薬を添加する。

| エンドプレップ反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|--|--------------|
| 第 2 鎖 cDNA 合成産物 (ステップ 2.8.10.) | 20 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer | 2.5 μ l |
| ● (緑色) NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix | 1.5 μ l |

- 2.9.2. 複数のサンプルを処理する場合は、マスターミックスを作製してもよい。
- 2.9.3. 20 μ l または 100 μ l のピペットを 20 μ l にセットし、10 回以上ピペティングして完全に混合する。スピンドウンして全溶液をチューブの底に落とす。
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。
- 2.9.4. 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 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分
65 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分
4 $^{\circ}\text{C}$ 、保持
すぐにアダプターライゲーションに進む。

2.10. アダプターライゲーション

- 2.10.1. ライゲーション反応を実施する前に●（赤色）NEBNext Adaptor* を氷冷した Adaptor Dilution Buffer で希釈する。希釈した NEBNext Adaptor は氷上に置いておく。

| トータル RNA インプット量 | 希釈率 |
|-----------------|----------------------------------|
| 25 ~ 250 ng | Adaptor Dilution Buffer で 50 倍希釈 |

* NEBNext アダプターは、別売の NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E6609、#E7600、#E7780、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448) に含まれる。

注意：インプット量ごとにアダプターの濃度を最適化する場合は、Appendix A の表 3.1.1 を参照すること。

- 2.10.2. ステップ 2.9.4. のエンドプレップ反応液に下記の試薬を氷上にて追添加する。

| アダプターライゲーション反応 | 1 サンプルあたりの液量 |
|---|--------------|
| エンドプレップ反応液 (ステップ 2.9.4.) | 24 µl |
| 希釈アダプター (ステップ 2.10.1.) | 2 µl |
| ●（赤色）NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix | 12 µl |
| 全液量 | 38 µl |

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

- 2.10.3. 100 µl のピペットを 35 µl にセットし、10 回以上ピペッ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。

- 2.10.4. Heat lid を 40°C 以下（またはオフ）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

4°C、保持

- 2.10.5. ステップ 2.10.4. の反応物に●（青色）の NEBNext UltraExpress USER Enzyme 2 µl を追添加する。Total volume は 40 µl になる。35 µl にセットしたピペットでゆっくりと 10 回混合する。

- 2.10.6. Heat lid を 45°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

すぐにアダプター付加 DNA の PCR 増幅に進む。

2.11. 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、2.11.1A. 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、2.11.1B. に従う。
各プライマー濃度は 5 µM、合計で 10 µM である。

2.11.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、2.11.1A. または 2.11.1B. を選択する。ステップ 2.10.6. のアダプター付加 DNA に以下の構成成分を添加する。

2.11.1A. 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 2.10.6.) | 40 µl |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 µl |
| Index (X) Primer/i7 Primer* ** | 5 µl |
| Universal PCR Primer/i5 Primer* ** | 5 µl |
| 全液量 | 100 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。

2.11.1B. 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 2.10.6.) | 40 µl |
| ● (青色) NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 50 µl |
| Index Primer Mix* | 10 µl |
| 全液量 | 100 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。

2.11.2. 100 µl または 200 µl のピペットを 90 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。

2.11.3. 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。表 2.11.3A を参照。

表 2.11.3A :

| 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 | 11** |
| 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 | ∞ | |

** 上記の PCR サイクル数は、高品質の Universal Human Reference Total RNA を用いた場合のサイクル数になる。サンプルの品質に応じて PCR サイクル数の最適化が必要な場合がある。サイクル数の最適化するには、Appendix A の表 3.2.2 を参照すること。

注意 : 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。

2.12. 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、必ず本プロトコールの比率に従い、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。

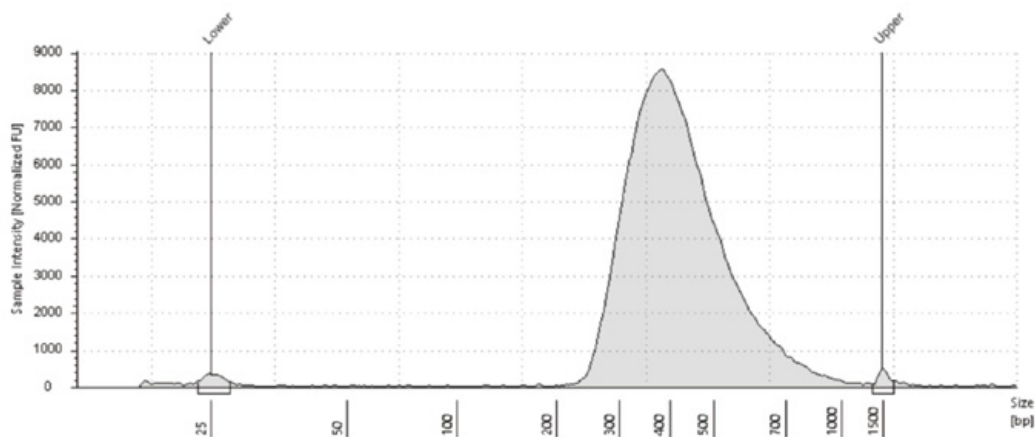
- 2.12.1. SPRIselect Beads または NEBNext Sample Purification Beads をボルテックスして再懸濁する。懸濁が不十分な場合、DNA 回収量が低下するため、十分に注意する。AMPure XP Beads を使用する場合、懸濁して 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁してから使用する。
- 2.12.2. 再懸濁したビーズ 70 μ l (0.7 X) を PCR 反応産物 (~ 100 μ l) に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。最後のピペティングの際には、チップ内の液体をすべて排出するよう注意すること。3 ~ 5 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。
- 2.12.3. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 2.12.4. 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。
- 2.12.5. 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)。
- 2.12.6. 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。
- 2.12.7. 5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 2.12.8. 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。
- 2.12.9. 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)。
- 2.12.10. 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。
- 2.12.11. ステップ 2.12.10. 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。
- 2.12.12. 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。
- 2.12.13. 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 23 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。
- 2.12.14. 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。
- 2.12.15. 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 20 μ l を新しい PCR チューブに移し、-20°C で保存する。

2.13. Agilent Bioanalyzer DNA Chip でのライブラリー品質評価

- 2.13.1. DNA 1000 chip を用いてライブラリー 1 μ l を泳動する。ライブラリーの収量が非常に少ない場合は、DNA High Sensitivity chip を用いて泳動する。その場合は、必要に応じてライブラリーを希釈してから泳動する。
- 2.13.2. 電気泳動図でライブラリーが約 300 bp のピークサイズを示していることを確認する。

注意： ~ 80 bp (プライマー) または 150 bp (アダプターダイマー) のピークが Bioanalyzer トレースに表示される場合は、0.1X TE バッファーでサンプル (ステップ 2.12.15.) を 50 μ l にし、45 μ l (0.9X) の SPRIselect Bead または NEBNext Sample Purification Bead で通常のビーズクリーンアップを実施すること。

図 2.13.2.1 : 250 μ g のヒトリファレンス RNA からのライブラリーのサイズ分布の例



Appendix A

インプット量ごとにアダプター希釈とPCRサイクル数を最適化する場合の推奨

NEBNext UltraExpress RNA Library Prep Kit は、使いやすさと柔軟性を念頭に設計されている。本ライブラリープロトコールでは、キットの全インプット範囲で単一のアダプター希釈とPCRサイクル数を使用することができる。もし更なるライブラリー収量の最適化が必要な場合には、下記の条件を参考に RNA インプット量ごとのアダプター希釈率および PCR サイクル数を最適化すること。

3.1. アダプター希釈

3.1.1. poly (A) 精製済の mRNA、または rRNA 除去済の RNA のトータル RNA 量に対するアダプター希釈率

表 3.1.1 :

| トータル RNA インプット量 | 希釈率 |
|-----------------|-----------------------------------|
| 76 ~ 250 ng | Adaptor Dilution Buffer で 20 倍希釈 |
| 25 ~ 75 ng | Adaptor Dilution Buffer で 100 倍希釈 |

3.2. PCR 増幅

3.2.1. poly (A) 精製した mRNA に対する推奨 PCR サイクル数

表 3.2.1 : トータル RNA インプット量に基づく推奨 PCR サイクル数

| トータル RNA インプット量 | 推奨 PCR サイクル数 |
|-----------------|--------------|
| 76 ~ 250 ng | 10 ~ 12** |
| 25 ~ 75 ng | 12 ~ 14** |

** 注意：上記の PCR サイクル数は、高品質の Universal Human Reference Total RNA を用いた場合のサイクル数になる。サンプルの品質によっては更なる最適化が必要となる場合もある。

3.2.2. rRNA 除去した RNA に対する推奨 PCR サイクル数

表 3.2.2 : トータル RNA インプット量に基づく推奨 PCR サイクル数

| トータル RNA インプット量 | 推奨 PCR サイクル数 |
|-----------------|--------------|
| 76 ~ 250 ng | 9 ~ 11** |
| 25 ~ 75 ng | 11 ~ 13** |

** 注意：上記の PCR サイクル数は、高品質の Universal Human Reference Total RNA を用いた場合のサイクル数になる。サンプルの品質によっては更なる最適化が必要となる場合もある。

Appendix B

NEBNext Ultra Express RNA Library Prep Kit (NEB #E3330) および NEBNext Unique Dual Index UMI adaptor for Illumina を併用した プロトコール

英語版マニュアルの Appendix B を参照

Appendix C FFPE RNA のプロトコール

英語版マニュアルの Appendix C を参照

Appendix D 長い RNA インサートのための断片化プロトコール

英語版マニュアルの Appendix D を参照

キットの構成

本キットに含まれる各試薬は、インプット範囲の最小量と最大量の Universal Human Reference Total RNA を用いてライブラリー調製することにより、機能検証および前ロットとの比較を実施している。前ロットと最新ロットは、同じイルミナフローセルで同時にシーケンスされ、個々の転写産物量、5' ~ 3' 転写産物カバレッジ、リファレンスにマッピングされたリードの割合など、さまざまなシーケンスメトリクスで比較されてから出荷されている。

NEB #E3330S 構成表

| NEB # | 製品 | 液量 |
|--------|---|----------|
| E3329A | NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix | 0.096 ml |
| E3331A | NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix | 0.024 ml |
| E3332A | NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent | 0.096 ml |
| E3333A | NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix | 0.72 ml |
| E3334A | NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix | 0.036 ml |
| E3335A | NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer | 0.06 ml |
| E3336A | NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix | 0.288 ml |
| E3337A | NEBNext UltraExpress USER Enzyme | 0.048 ml |
| E3338A | NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 1.2 ml |
| E7762A | NEBNext Adaptor Dilution Buffer | 2.4 ml |
| E3341A | 0.1X TE | 2.4 ml |
| E3342A | Nuclease-free Water | 0.096 ml |
| E3339A | NEBNext Bead Reconstitution Buffer | 0.96 ml |

NEB #E3330L 構成表

| NEB # | 製品 | 液量 |
|---------|---|----------|
| E3329AA | NEBNext UltraExpress RNA Fragmentation Mix | 0.384 ml |
| E3331AA | NEBNext UltraExpress First Strand Enzyme Mix | 0.096 ml |
| E3332AA | NEBNext UltraExpress Strand Specificity Reagent | 0.384 ml |
| E3333AA | NEBNext UltraExpress Second Strand Master Mix | 2.88 ml |
| E3334AA | NEBNext UltraExpress End Prep Enzyme Mix | 0.144 ml |
| E3335AA | NEBNext UltraExpress End Prep Reaction Buffer | 0.24 ml |
| E3336AA | NEBNext UltraExpress Ligation Master Mix | 1.16 ml |
| E3337AA | NEBNext UltraExpress USER Enzyme | 0.192 ml |
| E3338AA | NEBNext MSTC High Yield Master Mix | 4.8 ml |
| E7762AA | NEBNext Adaptor Dilution Buffer | 9.6 ml |
| E3341AA | 0.1X TE | 9.6 ml |
| E3342AA | Nuclease-free Water | 0.384 ml |
| E3339AA | NEBNext Bead Reconstitution Buffer | 3.84 ml |

改訂履歴：

| 改訂番号 | 内容 | 目付 |
|------|---|-------|
| 1.0 | 無し | 09/23 |
| 1.1 | Table 2.2 の値を更新 | 12/23 |
| 2.0 | Table 2.2 の値を更新 NEB ログの変更 | 02/24 |
| 3.0 | Poly(A) mRNA Express プロトコール (Section 1A) と Standard プロトコール (Section 1B) に更新 | 05/24 |
| 4.0 | rRNA Depletion Kit (Bacteria) and Globin & rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) を Section 2 および Appendix C に追加 | 10/25 |



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.

Products and content are covered by one or more patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc. (NEB). The use of trademark symbols does not necessarily indicate that the name is trademarked in the country where it is being read; it indicates where the content was originally developed. See www.neb.com/trademarks. The use of these products may require you to obtain additional third-party intellectual property rights for certain applications. For more information, please email busdev@neb.com.

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。

AGILENT® and BIOANALYZER® are registered trademarks of Agilent Technologies, Inc.

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

ILLUMINA® and TRUSEQ® are registered trademarks of Illumina, Inc.

QUBIT® is a registered trademark of Molecular Probes, 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