

NEBNext® Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina®

NEB #E7645S/L, #E7103S/L

24/96 reactions

英語版マニュアル Version 7.0 9/22 に対応

目次：

概要	3
プロトコール	4
末端処理	4
アダプターライゲーション	5
アダプター付加 DNA のサイズセレクションまたはクリーンアップ	6
サイズセレクション	6
クリーンアップ	8
アダプター付加 DNA の PCR 増幅	9
PCR 増幅	9
PCR 増幅産物のクリーンアップ	11
キット構成	13
改訂履歴	14

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 7.0 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/e7645-nebnext-ultra-ii-dna-library-prep-kit-for-illumina>)。

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Unique Dual Index UMI Adaptors DNA Set 1) (NEB #E7395) などの UMI 付きインデックスアダプターを使用する場合には、ウェブサイト製品ページより “manualE7103_E7645 w UMI Adaptors DNA” をご参照ください。

ライブラリーキットの内容：

キットには最大 24 反応 (NEB #E7645S/#E7103S) および 96 反応 (NEB #E7645L/#E7103L) の調製に十分な液量の試薬が含まれている。Package 1 に含まれる試薬は -20°C、Package 2 の試薬は室温で保存すること。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 Ultra II End Prep Enzyme Mix
- (緑色) NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer
- (赤色) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix
- (赤色) NEBNext Ligation Enhancer
- (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix

Package 2：室温保存。凍結しないこと。

NEBNext Ultra II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (NEB #E7103) にのみ含まれる。

NEBNext Sample Purification Beads

TIPS

アダプター/インデックスプライマーは別売なので注意！

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 (参考製品：NEB #B1500S/L)
- 0.1X TE (1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)
- PCR チューブ (独立または 8 連)、DNA 低結合タイプを推奨 (参考製品：Eppendorf® #022431021)
- NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E6609、#E7600、#E7780、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448)
詳細は www.neb.com/oligos を参照のこと

TIPS

リング状磁石タイプを推奨。無ければビーズがチューブ壁面に付くタイプであれば OK

- マグネットラック/スタンド (参考製品：NEB #S1515S)
- PCR 装置
- Agilent® Bioanalyzer® や TapeStation などの DNA 定性解析装置およびチップ
- マイクロ遠心機

TIPS

スピンドウンできるものであれば OK

NEB #E7645 のみ：

- SPRIselect® Reagent Kit (Beckman Coulter, Inc. #B23317) または AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
※NEB #E7103 にはビーズが付属している

オプション：

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.0 with 10 mM NaCl、または NEBNext Adaptor Dilution Buffer (NEB #B1430S)
(DNA インプットが 100 ng 以下の場合に必要、アダプターの希釈に使用)

概要：

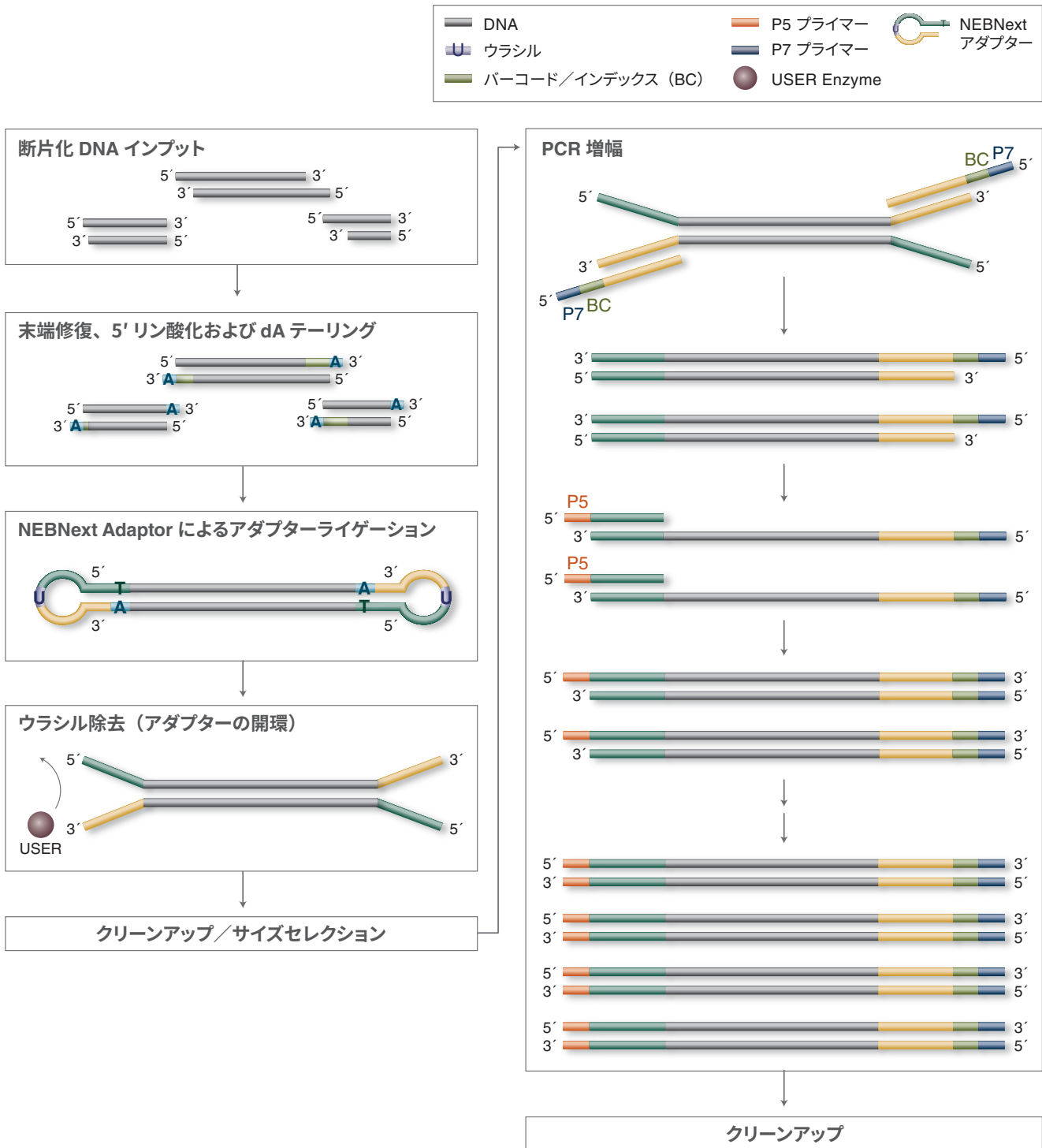
NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina には、イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリーを調製するために必要な酵素とバッファーが含まれている。様々な入力量の DNA から高品質なライブラリーを調製できる。また、迅速かつユーザーフレンドリーなワークフローによりハンズオン時間が最小限に短縮される。

キットの各構成は厳格な品質管理基準に適合していることが必要であり、各ロットについてはそれぞれ、試薬セット全体の機能的なバリデーションとして、ライブラリー調製およびイルミナシーケンスプラットフォーム上のシーケンスが行われている。

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

図 1：NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina のライブラリー調製ワークフロー



アダプタートリミング用の配列：


イルミナ社用の NEBNext シリーズで作製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。

Adaptor Read 1 AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA


Adaptor Read 2 AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

プロトコール：

記号

 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。

 プロトコールの一時停止可能なポイント。

インプット DNA：500 pg ~ 1 µg の断片化 DNA 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。断片化後の DNA 液量が 50 µl 未満の場合は、1X TE を加えて最終液量を 50 µl とする。サンプルを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) または 0.1 X TE で希釈することも可能である。

TIPS

- DNA サンプルは RNase などで RNA 除去しておく
- しっかりと定量しておく
- $A_{260/280}$ と $A_{260/230}$ を確認しておく

1. エンドブレップ（末端処理）

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	量
●（緑色） NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	3 µl
●（緑色） NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	7 µl
断片化 DNA	50 µl
全液量	60 µl

1.2. 100 µl または 200 µl のピペットを 50 µl にセットし、10 回以上ピペッティングして完全に混合、スピンドウンする。スピンドウンしてチューブ内の側面から全液体を回収する。


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。

1.3. 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 で 30 分間

65°C で 30 分間

4°C で保持

 サンプルを -20°C で保存することが可能であるが、わずかなライブラリー収量低下（約 20%）がおきる場合がある。次ステップのアダプターライゲーションを行ってから一時停止することを推奨。

2. アダプターライゲーション

2.1. アダプターの希釈が必要かどうか判断する。



DNA インプット量が100 ng 以下の場合、NEBNext Adaptor for Illumina を表 2.1 に示すように Tris/NaCl (pH 8.0) で希釈する。

表 2.1：アダプターの希釈

インプット量	アダプター希釈 (アダプター液量：全液量)	アダプター使用濃度
1 µg ~ 101 ng	希釈なし	15 µM
100 ng ~ 5 ng	10 倍 (1 : 10)	1.5 µM
5 ng 未満	25 倍 (1 : 25)	0.6 µM

注意：サンプルのインプット量および種類に応じて、アダプター希釈率を最適化することが必要な場合もある。ここには出発点として一般的な希釈率が示してある。アダプターライゲーションでの未反応アダプターは、次項のクリーンアップ/サイズセレクションで除去される。

TIPS

例えば DNA インプットが 50 ng の場合、NEBNext Adaptor を 3 µl、Tris/HCl を 27 µl で計 30 µl の 10 倍希釈アダプターを作っておくと良い。

2.2. 以下の試薬をエンドプレップ反応液に追添加する。

試薬	量
エンドプレップ反応液 (セクション 1 のステップ 1.3.)	60 µl
● (赤色) NEBNext Adaptor for Illumina*	2.5 µl
● (赤色) NEBNext Ligation Enhancer	1 µl
● (赤色) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix**	30 µl
全液量	93.5 µl

* 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。

** Ultra II Ligation Master Mix は、数回ピペティングして混合してから、反応液に添加する。

注意：Ligation Master Mix および Ligation Enhancer は事前に混合しておくことが可能であり、混合物は 4°C で 8 時間以上安定である。アダプターの事前混合は避けること。

2.3. 100 µl または 200 µl のピペットを 80 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 Ultra II 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反応効率には影響しない)。

2.4. Heat lid をオフにして、サーマルサイクラー内で 20°C で 15 分間、インキュベーションする。

2.5. ライゲーション反応液に、● (赤色) USER® Enzyme 3 µl を追添加する。

注意：ステップ 2.5. および 2.6. は NEBNext Adaptor を使用する場合にのみ必要である。USER enzyme 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。

TIPS

USER Enzyme はライブラリー調製キットではなく、インデックスプライマーキットの中に入っている。

2.6. ピペティングし、Heat lid を 47°C 以上に設定したサーマルサイクラー内で、37°C で 15 分間、インキュベーションする。



サンプルは -20°C で一晩保存可能

3. アダプター付加 DNA のサイズセレクションまたはクリーンアップ



インプット DNA の初期量に応じて精製方法を以下2つから選ぶ：

インプット DNA 量が 50 ng 以上の場合 → 3A：サイズセレクション

インプット DNA 量が 50 ng 以下の場合 → 3B：クリーンアップ

TIPS

サイズセレクションとは目的サイズより大きい/小さい DNA を除去すること、クリーンアップとは小さいものだけ（アダプターとかプライマーなど 150 bp 以下）を除去することを示す。

いずれもビーズには大きな DNA から優先的に接合するという性質を利用。

3A. サイズセレクション（インプット DNA が > 50 ng の場合）



注意：以降のプロトコールは 200 bp インサートのライブラリー用である。それ以外のインサートサイズの場合は、下表を元にビーズ量を設定すること。

TIPS

NEBNext Sample Purification Beads、SPRIselect、AMPure XP の 3 種類のビーズが使用可能である。ただし、AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

TIPS

ここに示すサイズセレクション方法は NEBNext 専用のものであり、一般的な Right/Left サイズセレクションの方法とは異なる。



サイズセレクションは2段階のビーズ精製を通して行う。その際は表 3.1 を参考に対象とする DNA サイズに合わせてビーズ量を変える。ステップ 3A.1. ~ 14. では 200 bp の場合を記載。

表 3.1：ビーズを使用したサイズセレクションの推奨条件

ライブラリー パラメーター	インサートのサイズ	150 bp	200 bp	250 bp	300 ~ 400 bp	400 ~ 500 bp	500 ~ 700 bp
最終的なライブラリーのおおよそのサイズ (インサート+アダプター+プライマー)		270 bp	320 bp	370 bp	480 bp	600 bp	750 ~ 800 bp
ビーズ液量 (μ l)	1 回目ビーズ液量	50	40	30	25	20	15
	2 回目ビーズ液量	25	20	15	10	10	10

3A.1. SPRIselect 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。

3A.2. 再懸濁したビーズ 40 μ l (~ 0.4 X) を 96.5 μ l のライゲーション反応物に添加する。10 回以上ピペッティングして十分に混合する。3 ~ 5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にスピンドウンする場合には、ビーズが沈殿する前に必ず遠心機を停止する。

TIPS

ボルテックスをする場合、8 連チューブの蓋が外れやすいので注意！

3A.3. サンプルを静置して、5 分間以上、室温でインキュベーションする。

TIPS

ここではまだマグネットスタンドにセットしない。

3A.4. チューブまたはプレートを適切な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。設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。

3A.5. 5 分後（または溶液が透明になったら）、上清を新しいチューブに移す。ビーズを持ちこまないこと（注意：上清に目的 DNA がある）。なお、ビーズには目的とするサイズよりも大きい DNA 断片が結合している。

3A.6. 再度懸濁した SPRIselect または NEBNext Sample Purification Beads の 20 μ l (0.2 X) を上清に添加し、少なくとも 10 回混合する。続いて、サンプルを静置して、5 分間以上、室温でインキュベーションする。

3A.7. チューブまたはプレートを適切な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。設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。

3A.8. 5 分後（または溶液が透明になったら）、ビーズに触れないように上清を破棄する（注意：ビーズを廃棄しないこと）。なおビーズには目的サイズの DNA が結合、上清には目的サイズより小さい DNA（アダプターを含む）が残っている。

- 3A.9. 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。懸濁の必要はない。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を破棄する。ターゲット DNA が結合したビーズに触れないよう注意する。
- 3A.10. ステップ 3A.9. をさらに 1 回繰り返す。2 回目の洗浄後は、液残りがないようにできる限り上清を破棄する。p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
- 3A.11. マグネットスタンド上に設置した状態で、チューブまたはプレートの蓋を開けて最長 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。

TIPS

結構湿っているくらいがベスト。
事前に動画を確認しておくことを推奨。



- 3A.12. 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 17 μ l の 10 mM Tris-HCl または 0.1 X TE を添加してターゲット DNA を溶出する。
- 3A.13. 10 回のピペッ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。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に戻す前に、必要に応じてスピンドウンする。

TIPS

ボルテックスをする場合、蓋が外れやすいので注意！

- 3A.14. 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する。5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清の 15 μ l を新しい PCR チューブに移して、セクション 4 (9 ページ) に進む。



サンプルは -20°C で保存可能

TIPS

物質は安定な状態ではあるものの、PCR で増幅してから長期保管した方が望ましい。

3B. クリーンアップ (インプット DNA が < 50 ng の場合)

TIPS

NEBNext Sample Purification Beads、SPRIselect、AMPure XP の 3 種類のビーズが使用可能である。ただし、AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

TIPS

ここに示すクリーンアップ方法は NEBNext 専用のものであり、一般的なクリーンアップ方法とは異なる。

3B.1. SPRIselect 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。

3B.2. 再懸濁したビーズ 87 μ l (0.9 X) をアダプターライゲーション反応物に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。3 ~ 5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にスピンドウンする場合には、ビーズが沈殿する前に必ず遠心機を停止する。

TIPS

ボルテックスをする場合、8 連チューブの蓋が外れやすいので注意！

3B.3. サンプルを静置して、5 分間以上、室温でインキュベーションする。

TIPS

ここではまだマグネットスタンドにセットしない。

3B.4. チューブまたはプレート適切な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。設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。

3B.5. 5 分後 (または溶液が透明になったら)、ビーズに触れないように上清を破棄する (注意: ビーズを廃棄しないこと)。なお、上清には目的サイズより小さい DNA (アダプターを含む) が残っている。

3B.6. 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。懸濁の必要はない。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を破棄する。ターゲット DNA が結合したビーズに触れないよう注意する。

3B.7. ステップ 3B.6. をさらに 1 回繰り返す。2 回目の洗浄後は、液残りがないようにできる限り上清を破棄する。p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。

3B.8. マグネットスタンド上に設置した状態で、チューブまたはプレートの蓋を開けて最長 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。

TIPS

結構湿っているくらいがベスト。
事前に動画を確認しておくことを推奨。



3B.9. 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 17 μ l の 10 mM Tris-HCl または 0.1 X TE を添加してターゲット DNA を溶出する。

3B.10. 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 分間以上インキュベーションする。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に戻す前に、必要に応じてスピンドウンする。

TIPS

ボルテックスをする場合、蓋が外れやすいので注意！

3B.11. 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する。5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清の 15 μ l を新しい PCR チューブに移して、セクション 4 (9 ページ) に進む。



サンプルは -20°C で保存可能

TIPS

物質は安定な状態ではあるものの、PCR で増幅してから長期保管した方が望ましい。

4. アダプター付加 DNA の PCR 増幅

 以下の NEB プライマー（Forward/Reverse プライマーが個別のチューブに含まれる）を使用する場合は、セクション 4.1.1A. に従う。

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 1、NEB #E7335)


NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 2、NEB #E7500)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 3、NEB #E7710)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Set 4、NEB #E7730)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1、NEB #E7600)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 2、NEB #E7780)

 以下の NEB プレミックスプライマー（Forward/Reverse プライマーミックスが1つのチューブに入っている）を使用する場合は、セクション 4.1.1B. に従う。

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Index Primers、NEB #E6609)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Unique Dual Index Primer Pairs Set 1-5、NEB #E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448)

TIPS

- サンプル品：E7335G の場合は A の方でセットアップ
- サンプル毎に異なるインデックスプライマーを使用することに注意！マスターミックスは作らない！
- クロスコンタミを防ぐため、しっかりとチップを変えて添加する

4.1 PCR 増幅

4.1.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、4.1.1A. または 4.1.1B. を選択する。

滅菌済みストリップチューブに以下の構成を添加する。

4.1.1A. 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	添加量
アダプター付加 DNA (ステップ 3A.14. または 3B.11.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index Primer/i7 Primer ^{* **}	5 µl
● (青色) Universal PCR Primer/i5 Primer ^{* ** **}	5 µl
全液量	50 µl

4.1.1B. 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	添加量
アダプター付加 DNA (ステップ 3A.14. または 3B.11.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index/Universal Primer ^{* ** **}	10 µl
全液量	50 µl

* プライマーは、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E7600、#E7780) に含まれる。Dual Index Primers (NEB #E7600、#E7780) を使用する場合は、製品マニュアルに有効なバーコードの組み合わせと PCR 反応の設定が記載されている。

** NEBNext Multiplex Oligos (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730) を使用する場合は、各 PCR 反応に1種類のインデックスプライマーのみを使用する。Dual Index Primers (NEB #E7600、#E7780) を使用する場合は、1反応あたり1つの i7 プライマーのみを使用する。

*** Dual Index Primers (NEB #E7600、#E7780) を使用する場合は、1反応あたり1つの i5 プライマーのみを使用する。

**** プライマーは、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB #E6609、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448) に含まれる。特に低プレックス時の有効なバーコードの組み合わせ、または PCR 反応の設定は、各製品マニュアルを参照する。

4.1.2. 100 µl または 200 µl のピペットを 40 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。

4.1.3. サーマルサイクラーにチューブをセットし、下記のサイクル条件を用いて PCR を行う。
 サイクル数はインプット DNA の量に応じて決定する。表 4.1 を参考にするが、量だけではなくサンプル種によっては最適化が必要である。なおターゲット濃縮を行う場合には表 4.2 を参考にすること。

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	1
変性	98°C	10 秒	3 ~ 15*
アニーリング/伸長	65°C	75 秒	
最終伸長	65°C	5 分	1
保持	4°C	∞	

* インプット DNA に対して過剰なサイクル数を用いた場合、PCR Artifact (Bioanalyzer 等による電気泳動で高分子側にピークが出現する) や PCR バイアス (増幅エラー) が発生するリスクがあるため、適切なサイクル数を用いるとよい。

表 4.1：一般的なライブラリー調製の推奨サイクル数

インプット DNA	約 100 ng (30 ~ 100 nM) のライブラリー調製に必要なサイクル数
1 µg*	3**
500 ng*	3**
100 ng*	3
50 ng	3 ~ 4
10 ng	6 ~ 7
5 ng	7 ~ 8
1 ng	9 ~ 10
0.5 ng	10 ~ 11

* このインプット範囲は、サイズセレクションが行われた場合 (3A: インプット DNA が 50 ng 以上の場合) に最適に機能する。

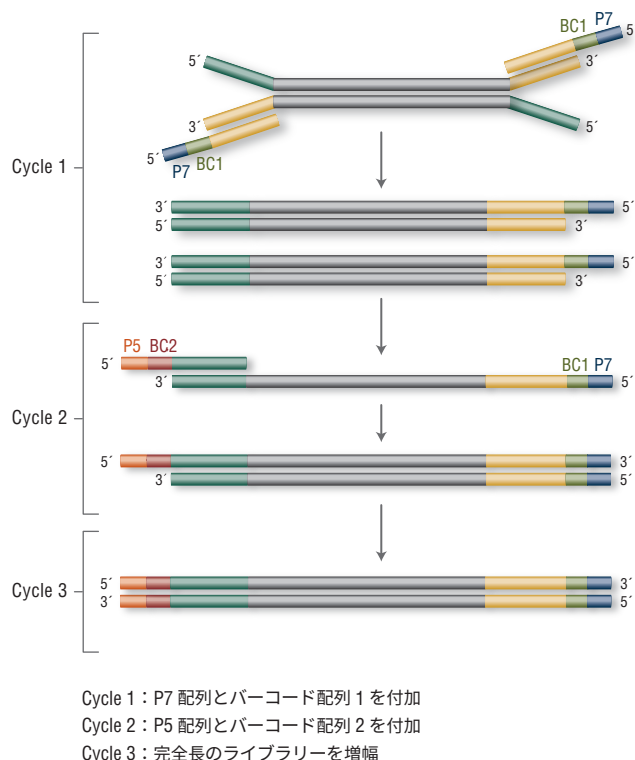
** NEBNext アダプターには P5/7 配列は含まれていないため、完全なライブラリーを調製するためには、少なくとも 3 回の増幅サイクルが必要である (右図参照)。

表 4.2：ターゲット濃縮用に必要なサイクル数

インプット DNA	ターゲット濃縮用ライブラリー調製 (約 1 µg) に必要なサイクル数
1 µg*	3 ~ 4* **
500 ng*	4 ~ 5*
100 ng*	6 ~ 7*
50 ng	7 ~ 8
10 ng	9 ~ 10
5 ng	10 ~ 11
1 ng	12 ~ 13
0.5 ng	14 ~ 15

* このインプット範囲は、サイズセレクションが行われた場合 (3A: インプット DNA が 50 ng 以上の場合) に最適に機能する。

** NEBNext アダプターには P5/7 配列は含まれていないため、完全なライブラリーを調製するためには、少なくとも 3 回の増幅サイクルが必要である (右図参照)。



4.1.4. セクション 5 の PCR 増幅産物のクリーンアップに進む。

5. PCR 増幅産物のクリーンアップ

TIPS

NEBNext Sample Purification Beads、SPRIselect、AMPure XP の 3 種類のビーズが使用可能である。ただし、AMPure XP を使用する場合は、30 分以上かけて室温に戻すこと。

TIPS

ここに示すクリーンアップ方法は NEBNext 専用のものであり、一般的なクリーンアップ方法とは異なる。

TIPS

ここではインプット DNA の量に関わらず、共通のプロトコールで精製（ビーズ量は一定）。

- 5.1. SPRIselect 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。
- 5.2. 再懸濁したビーズ 45 μ l (0.9 X) を PCR 反応産物に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。3 ~ 5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にスピンドウンする場合には、ビーズが沈殿する前に必ず遠心機を停止する。

TIPS

ボルテックスの場合、蓋が外れやすいので注意！

- 5.3. サンプルを静置して、5 分間以上、室温でインキュベーションする。
- 5.4. チューブまたはプレート を適切な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。設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。
- 5.5. 5 分後（または溶液が透明になったら）、ビーズに触れないように上清を破棄する（注意：ビーズを廃棄しないこと）。なお、上清には目的サイズより小さい DNA（アダプターを含む）が残っている。
- 5.6. 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。懸濁の必要はない。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を破棄する。ターゲット DNA が結合したビーズに触れないよう注意する。
- 5.7. ステップ 5.6. をさらに 1 回繰り返す。2 回目の洗浄後は、液残りがないようにできる限り上清を破棄する。p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
- 5.8. マグネットスタンド上に設置した状態で、チューブまたはプレートの蓋を開けて最長 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。

TIPS

結構湿っているくらいがベスト。
事前に動画を確認しておくことを推奨。



- 5.9. 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 10 mM Tris-HCl または 0.1 X TE を添加してターゲット DNA を溶出する。
- 5.10. 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 分間以上インキュベーションする。チューブまたはプレート をマグネットスタンド上に戻す前に、必要に応じてスピンドウンする。
- 5.11. 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する。5 分後（または溶液が透明になったら）、上清の 30 μ l を新しい PCR チューブに移し増幅する。
- 5.12. Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA チップ上でサイズ分布を確認する。ライブラリー収量によっては、純水で希釈したものを測定する（3 ~ 5 倍希釈が適していることが多い）。

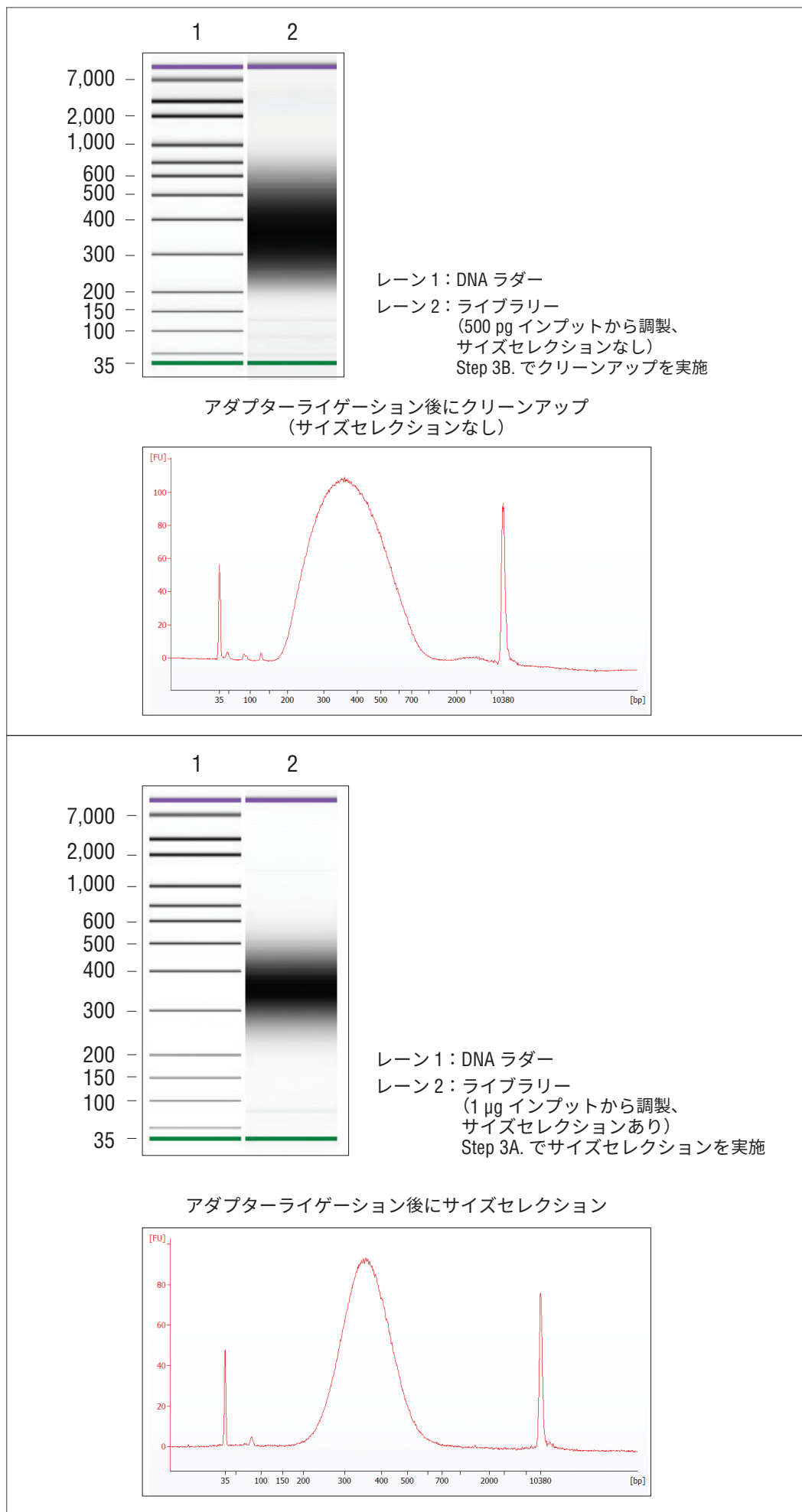


サンプルは -20°C で保存可能

TIPS

ここまでできたらライブラリーは安定な 2 本鎖 DNA なので、-20°C で安定保存が可能。

図 5.1：ヒト DNA (NA19240) を使用したライブラリー調製例



キットの構成品

NEB #E7645S

NEB #	製品	液量
E7646A	NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.072 ml
E7647A	NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	0.168 ml
E7648A	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	0.720 ml
E7374A	NEBNext Ligation Enhancer	0.024 ml
E7649A	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	0.6 ml

NEB #E7645L

NEB #	製品	液量
E7646AA	NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.288 ml
E7647AA	NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	0.672 ml
E7648AA	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	2.88 ml
E7374AA	NEBNext Ligation Enhancer	0.096 ml
E7649AA	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	2.4 ml

NEB #E7103S (DNA 精製ビーズ付きキット)

NEB #	製品	液量
E7646A	NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.072 ml
E7647A	NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	0.168 ml
E7648A	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	0.720 ml
E7374A	NEBNext Ligation Enhancer	0.024 ml
E7649A	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	0.6 ml
E7104S	NEBNext Sample Purification Beads	4 ml

NEB #E7103L (DNA 精製ビーズ付きキット)

NEB #	製品	液量
E7646AA	NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.288 ml
E7647AA	NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	0.672 ml
E7648AA	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	2.88 ml
E7374AA	NEBNext Ligation Enhancer	0.096 ml
E7649AA	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	2.4 ml
E7104L	NEBNext Sample Purification Beads	16 ml

※各反応に使用する試薬は、モジュールとして個別販売。
詳細はウェブサイト (www.neb.com) を参照。

改訂履歴：

改訂番号	内容	日付
1.1	12 ページの図 1.1：ヒト DNA (NA10240) をヒト DNA (NA19240) に修正	
2.0	オリゴキット：NEB #E7710 および NEB #E7730 を追加	2016/6
3.0	製品規定および書式設定を変更。アダプター希釈液の推奨を Tris-HCl with NaCl のみに変更。サイズセレクションおよびクリーンアップのプロトコルを明確化。PCR セクションから 25 μM のインデックスプライマーを削除。チェックリストスタイルのプロトコルを追加。プライマー濃度をすべて 15 μM に統一したため、PCR 設定ステップのセクション C を削除	2016/7
3.1	表 3.1、「最終ライブラリーの平均サイズ」の行数を調整	2016/9
3.2	ステップ 4.1.3. の表 4.1 の最小 PCR サイクル数を修正	2016/10
3.3	ステップ 4.1.3. の表 4.1 の PCR サイクルを更新、#E7103 のマニュアルと統合。ワークフロー模式図を更新。プロトコル文を編集	2017/7
4.0	「キット構成表 — 構成表」を追加。個別の構成表情報ページを削除	2018/4
5.0	表 4.2 の 100 ng および 50 ng の列の必要サイクル数を更新	2018/6
6.0	マニュアルフォーマットの変更（内容に変更なし）	2020/4
6.1	ライセンス条項を更新	2020/5
7.0	「キットの他に別途準備が必要なもの」とプロトコルをアップデート	2022/9



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®、USER® は、New England Biolabs, Inc. の商標または登録商標です。

ILLUMINA®、TRUSEQ® and MISEQ® are registered trademarks of Illumina, Inc.
 AGILENT®、BIOANALYZER® are registered trademark of Agilent Technologies, Inc.
 AMPURE® and SPRISELECT® are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc.
 EPPENDORF® is a registered trademark of Eppendorf AG.

© 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