

# NEBNext® Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina®

NEB #E7805S/L, #E6177S/L

24/96 reactions

英語版マニュアル Version 4.0 7/23 に対応

## 目次：

概要 .....	2
ワークフロー .....	3
プロトコール	
Section 1	
≤ 100 ng インプットからのライブラリー調製プロトコール .....	4
Section 2	
≥ 100 ng インプットからのライブラリー調製プロトコール .....	11
Section 3	
大きなサイズ (> 550 bp) のライブラリー調製プロトコール .....	19
キットの構成 .....	27
改定履歴 .....	28

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/e7805-nebnext-ultra-ii-fs-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 “manualE6177\_E7805 w UMI Adaptors DNA” をご参照ください。

### 注意点

- NEBNext Ultra II FS キットはゲノム DNA やプラスミド DNA、長さの長いアンプリコンでの使用を前提としている
- バイサルファイト変換ワークフローには適していない。メチル化解析には NEBNext Enzymatic Methyl-seq v2 Kit (NEB #E8015) を推奨
- FFPE DNA サンプルの断片化には下記のどちらかのワークフローを推奨
  - Covaris® 等での物理的断片化 + NEBNext Ultra II DNA キット (NEB #E7645)
  - FFPE DNA 専用キット (NEB #E6650 または NEB #E6655)

## ライブラリーキットの内容：

キットには最大 24 反応 (NEB #E7805S/#E6177S) および 96 反応 (NEB #E7805L/#E6177L) の調製に十分な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

- (黄色) NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix
  - (黄色) NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer
  - (赤色) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix
  - (赤色) NEBNext Ligation Enhancer
  - (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix
- TE Buffer (1X)

### Package 2：室温保存。凍結しないこと。

NEBNext Ultra II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (NEB#E6177) にのみ含まれる。

NEBNext Sample Purification Beads

## キットの他に別途準備が必要なもの：

### 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！

- 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)
- 0.2 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 (NEB #E7335、#E7500、#E7710、#E7730、#E6609、#E7600、#E7780、#E6440、#E6442、#E6444、#E6446、#E6448)  
詳細は [www.neb.com/oligos](http://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
- ボルテックス
- 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 #E7805 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：

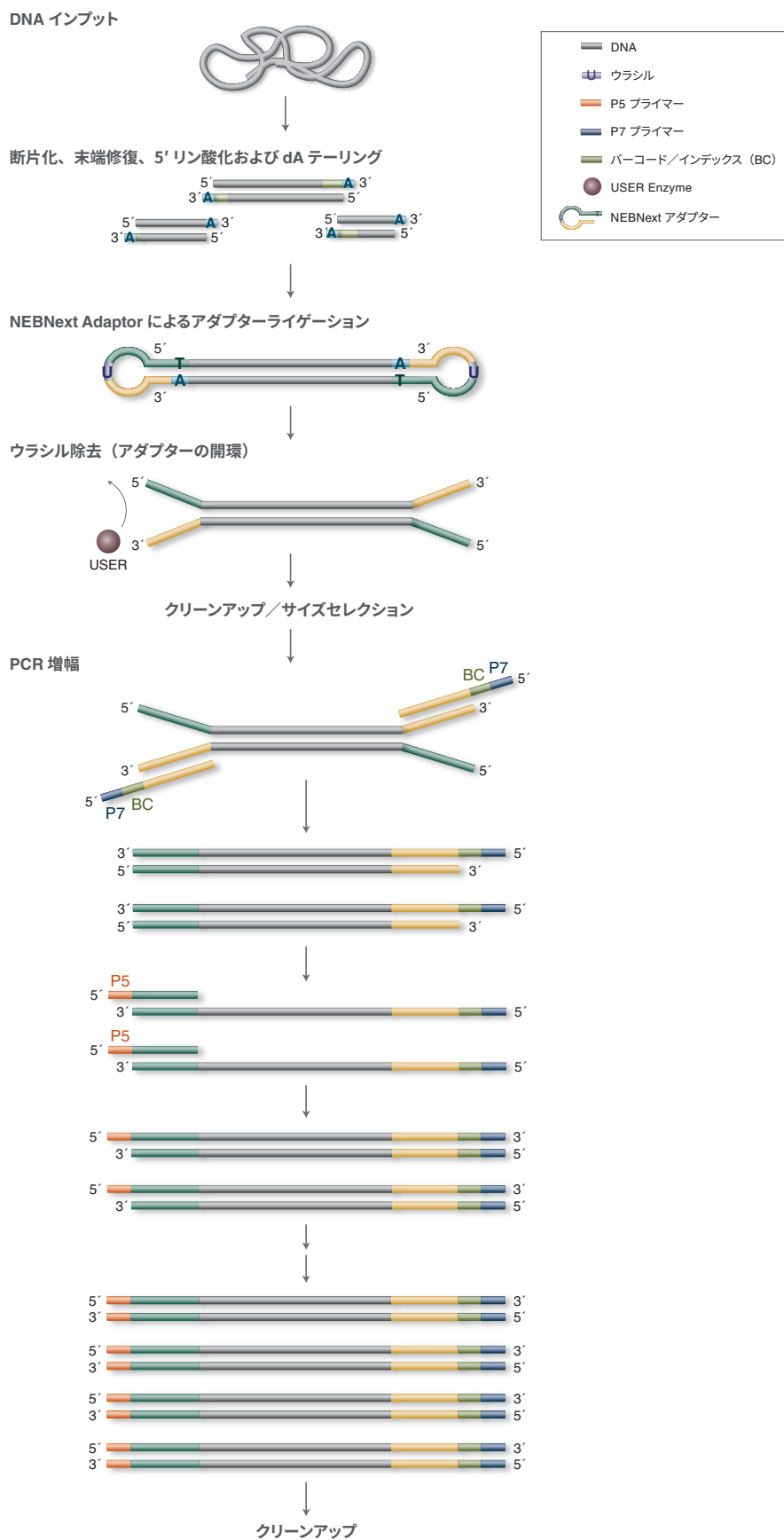
NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina には、イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリーを調製するために必要な酵素とバッファーが含まれている。様々なインプット量の DNA から高品質なライブラリーを調製できる。また、迅速かつユーザーフレンドリーなワークフローによりハンズオン時間が最小限に短縮される。

キットの各構成部品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で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 FS 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 シリーズで作成したライブラリーは TruSeq<sup>®</sup> 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

## Section 1

### ≦ 100 ng インプットからのライブラリー調製プロトコール

インプット量およびライブラリーサイズによって下記セクションから選択する：

インプット量が ≦ 100 ng → Section 1

インプット量が ≧ 100 ng → Section 2

大きなサイズ (> 550 bp) の場合 → Section 3

#### 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 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。

**インプット DNA** : 100 pg ~ 100 ng のゲノム DNA (未切断) を使用する。DNA は 1X TE (10 mM Tris pH 8.0、1 mM EDTA) に溶解しておく。低濃度 EDTA の 10 mM Tris (pH7.5 ~ 8.0) あるいは水に溶解した DNA でも良い。DNA 液量が 26  $\mu$ l 未満の場合は、キット付属の TE を加えて最終液量を 26  $\mu$ l とする。

#### TIPS

- DNA サンプルは RNase などで RNA 除去をしておく
- 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

### 1.1. 断片化&エンドプレップ (末端処理)

37°C の反応中、DNA 断片化とエンドプレップが同時に行われる。下記表を参考にして、目的の断片化サイズの反応時間を設定する。サンプルによってはさらに最適化が必要な場合がある。図 1.1 は典型的な断片化パターンを示す。

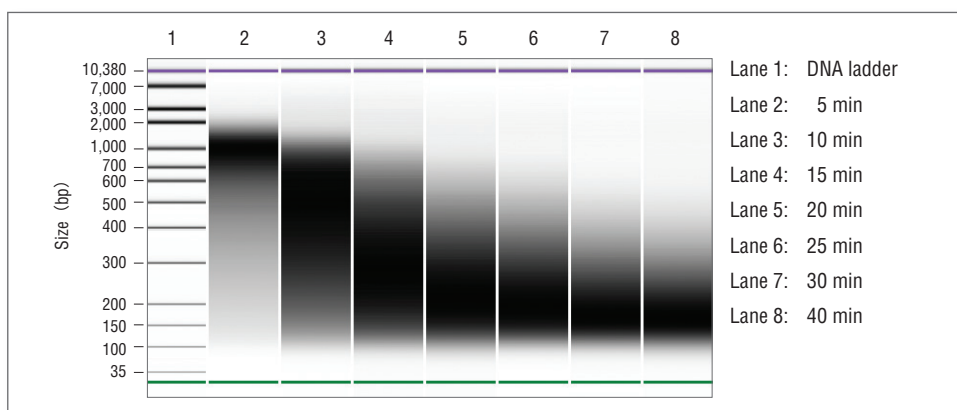
断片化サイズ	反応時間 (37°C)	最適化範囲
100 bp ~ 250 bp	30 分	30 ~ 40 分
150 bp ~ 350 bp	20 分	20 ~ 30 分
200 bp ~ 450 bp	15 分	15 ~ 20 分
300 bp ~ 700 bp	10 分	5 ~ 15 分
500 bp ~ 1 kb	5 分	5 ~ 10 分

1.1.1. Ultra II FS Reaction Buffer を完全に融解する。もし沈殿や結晶が見られる場合 (主にマグネシウム)、ピペッティングでこれらをできる限り細かくして、ボルテックスする。使用まで氷上で保存する。仮に沈殿や結晶が残存していても性能には影響ない。

1.1.2. Ultra II FS Enzyme Mix を 5 ~ 8 秒間ボルテックスして氷上で保存する。

**注意：Enzyme Mix は必ずボルテックスで混合する。混合が不十分な場合は断片化効率が低下する。**

図 1.1：ヒトゲノム DNA (NA19240) の典型的な断片化パターン (Bioanalyzer)



1.1.3. 0.2 ml PCR チューブに以下の試薬を添加する。

試薬	1 ライブラリーあたりの添加量
DNA	26 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	7 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	2 $\mu$ l
全液量	35 $\mu$ l

1.1.4. 5 秒間ボルテックスして、スピンドウンする。

1.1.5. Heat lid を 75°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。

**37°C で 5 ~ 30 分間 (反応時間はステップ 1.1. で設定)**

**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。

## 1.2. アダプターライゲーション

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、● (赤色) NEBNext Adaptor for Illumina を表 1.2.1 に示すように 10 mM Tris + 10 mM NaCl (pH7.5 ~ 8.0) で希釈する。

表 1.2.1: 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
100 ng ~ 500 ng	希釈なし	15 $\mu$ M
5 ng ~ 99 ng	10 倍 (1 : 10)	1.5 $\mu$ M
5 ng 未満	25 倍 (1 : 25)	0.6 $\mu$ M

**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。**

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

1.2.1. 以下の試薬を FS Reaction Mixture に追添加する。

試薬	添加量
FS Reaction Mixture (ステップ 1.1.5.)	35 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Adaptor for Illumina*	2.5 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Ligation Enhancer	1 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix**	30 $\mu$ l
全液量	68.5 $\mu$ l

\* 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、数回ピペッ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。**

1.2.2. 100  $\mu$ l または 200  $\mu$ l のピペットを 50  $\mu$ l 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 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)。

1.2.3. 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。

1.2.4. ライゲーション反応液（ステップ1.2.3.）に、●（赤色）USER<sup>®</sup> Enzyme 3 µl を追添加する。

**注意：ステップ1.2.4. および1.2.5. は NEBNext Adaptor を使用する場合にはのみ必要である。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。

1.2.5. 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**

### 1.3. アダプター付加 DNA 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。

1.3.1. SPRIselect または NEBNext Sample Purification Beads をボルテックスして懸濁する。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。

1.3.2. 再懸濁したビーズ 57 µl (0.8X) 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！

1.3.3. 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。

1.3.4. 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。

1.3.5. 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。

1.3.6. 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 µl（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。

1.3.7. ステップ1.3.6. 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。

1.3.8. 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。



1.3.9. 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 µl の 0.1X TE（1X TE を純水で 10 倍希釈）を添加してターゲット DNA を溶出する。

1.3.10. 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！

- 1.3.11. 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 µl を新しい PCR チューブに移して、ステップ 1.4. 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。

#### 1.4. 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、ステップ 1.4.1A. 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、ステップ 1.4.1B. 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

- 1.4.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、1.4.1A. または 1.4.1B. 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。

##### 1.4.1A. 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	量
アダプター付加 DNA (ステップ 1.3.12.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index Primer/i7 Primer <sup>**</sup> ***	5 µl
● (青色) Universal PCR Primer/i5 Primer <sup>**</sup> ****	5 µl
全液量	50 µl

##### 1.4.1B. 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	量
アダプター付加 DNA (ステップ 1.3.12.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index/Universal Primer <sup>**</sup> ****	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。

1.4.2. 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。

1.4.3. 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 1.4.1 を参考にしたが、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 1.4.2 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 秒間	1
変性	98°C	10 秒間	3 ~ 13*
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	∞	

\* 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 1.4.1: 一般的なライブラリー調製の推奨サイクル数

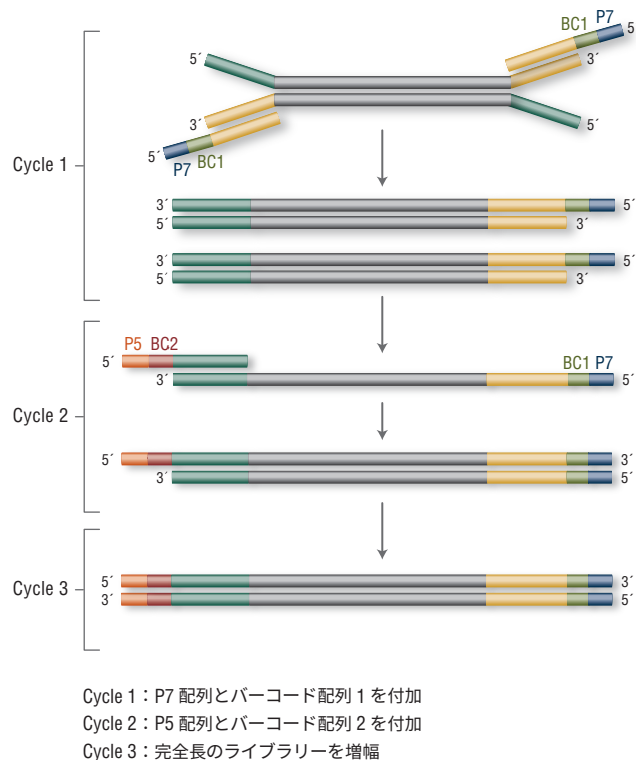
インプット DNA	~ 100 ng (5 ~ 35 nM) のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
100 ng	3 ~ 4
50 ng	4 ~ 5
10 ng	6 ~ 7
5 ng	7 ~ 8
1 ng	8 ~ 9
0.5 ng	8 ~ 10
0.1 ng	12 ~ 13

\* サイクル数は、サイズセレクションをしないライブラリー調製で検証。

表 1.4.2: ターゲット濃縮に必要なサイクル数

インプット DNA	~ 750 ng ~ 1 µg のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
100 ng	4 ~ 5
50 ng	5 ~ 6
10 ng	8 ~ 9
5 ng	9 ~ 10
1 ng	11 ~ 12
0.5 ng	12 ~ 13
0.1 ng	N/A

\* サイクル数は、サイズセレクションをしないライブラリー調製で検証。



1.4.4. ステップ 1.5. の PCR 増幅産物のクリーンアップに進む。

## 1.5. 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。

- 1.5.1. 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、再懸濁をしてから使用する。
- 1.5.2. 再懸濁したビーズ 45  $\mu$  (0.9X) 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！

- 1.5.3. サンプルを静置して、5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 1.5.4. チューブまたはプレートに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。
- 1.5.5. 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。
- 1.5.6. 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  $\mu$  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。
- 1.5.7. ステップ 1.5.6. 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。
- 1.5.8. 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。



- 1.5.9. 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  $\mu$  l の 0.1X TE（1X TE を純水で 10 倍希釈）を添加してターゲット DNA を溶出する。
- 1.5.10. 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。
- 1.5.11. 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  $\mu$  l を新しい PCR チューブに移す。これがイルミナシーケンサー用ライブラリーである。ライブラリーは  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存できる。

### 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、 $-20^{\circ}\text{C}$  で安定保存が可能。

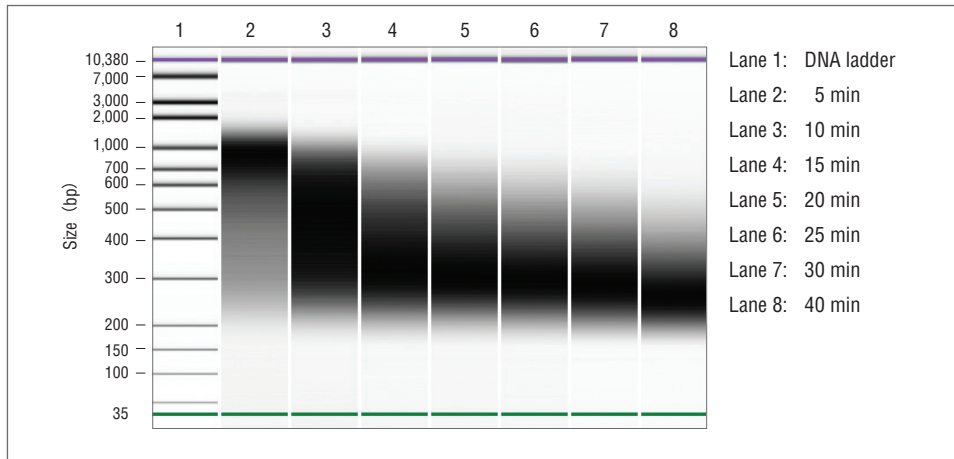
## 1.6. Bioanalyzer によるライブラリーの品質検証

- 1.6.1. ステップ1.5.11. のライブラリーを 0.1X TE Buffer で 5 倍希釈する。インプット量が 1 ng 未満であった場合、希釈は必要ないことが多い。
- 1.6.2. 1  $\mu$ l の希釈ライブラリーを Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA チップにアプライして、サイズ分布を確認する。目的のサイズピークが観察されればよい。

**注意：**ライブラリーサイズは、断片化 DNA サイズにアダプターとプライマーが付加したサイズになる (+ 120 bp)。

**注意：**目的ピーク以外に ~ 80 bp (プライマー) や 128 bp (アダプターダイマー) のピークが観察された場合、再精製してこれらを除去することを推奨する(フローセルに結合するため)。0.1X TE Buffer を使用してライブラリー容量を 50  $\mu$ l にして、ステップ1.5. のクリーンアップを行う。インプット量が 1 ng 未満であった場合に、アダプターダイマーを生じることがある。

図 1.2：断片化時間とライブラリーサイズ (ヒト DNA : NA 19240 での検証例)



## Section 2

### ≧ 100 ng インプットからのライブラリー調製プロトコール

インプット量およびライブラリーサイズによって下記セクションから選択する：

インプット量が ≦ 100 ng → Section 1

インプット量が ≧ 100 ng → Section 2

大きなサイズ (> 550 bp) の場合 → Section 3

#### 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 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。

**インプット DNA**：100 ng ~ 500 ng のゲノム DNA (未切断) を使用する。DNA は 1X TE (10 mM Tris pH 8.0、1 mM EDTA) に溶解しておく。低濃度 EDTA の 10 mM Tris (pH7.5 ~ 8.0) あるいは水に溶解した DNA でも良い。DNA 液量が 26  $\mu$ l 未満の場合は、キット付属の TE を加えて最終液量を 26  $\mu$ l とする。

#### TIPS

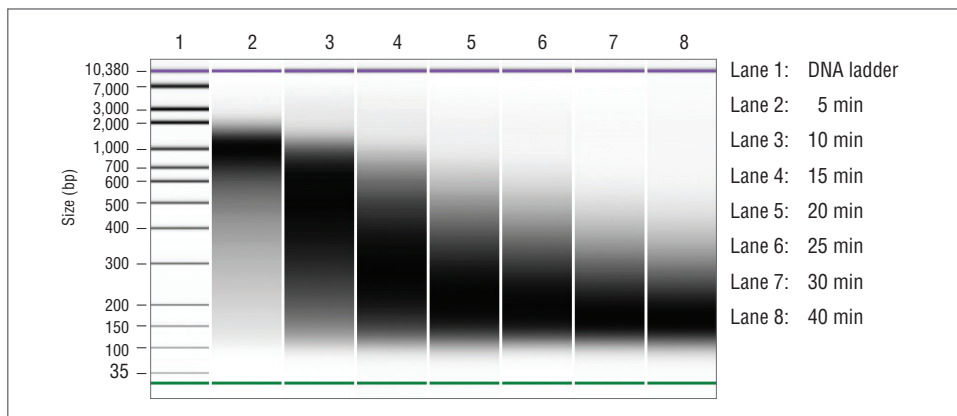
- DNA サンプルは RNase などで RNA 除去をしておく
- しっかりと定量しておく
- $A_{260/280}$  と  $A_{260/230}$  を確認しておく

### 2.1. 断片化&エンドプレップ (末端処理)

37°C の反応中、DNA 断片化とエンドプレップが同時に行われる。下記表を参考にして、目的の断片化サイズの反応時間を設定する。サンプルによってはさらに最適化が必要な場合がある。図 2.1 は典型的な断片化パターンを示す。

断片化サイズ	反応時間 (37°C)	最適化範囲
100 bp ~ 250 bp	30 分	30 ~ 40 分
150 bp ~ 350 bp	20 分	20 ~ 30 分
200 bp ~ 450 bp	15 分	15 ~ 20 分
300 bp ~ 700 bp	10 分	5 ~ 15 分
500 bp ~ 1 kb	5 分	5 ~ 10 分

図 2.1：ヒトゲノム DNA (NA19240) の典型的な断片化パターン (Bioanalyzer)



- 2.1.1. Ultra II FS Reaction Buffer を完全に融解する。もし沈殿や結晶が見られる場合 (主にマグネシウム)、ピペティングでこれらをできる限り細かくして、ボルテックスする。使用まで氷上で保存する。仮に沈殿や結晶が残存していても性能には影響ない。
- 2.1.2. Ultra II FS Enzyme Mix を 5 ~ 8 秒間ボルテックスして氷上で保存する。

**注意**：Enzyme Mix は必ずボルテックスで混合する。混合が不十分な場合は断片化効率が低下する。

2.1.3. 0.2 ml PCR チューブに以下の試薬を添加する。

試薬	1 ライブラリーあたりの添加量
DNA	26 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	7 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	2 $\mu$ l
全液量	35 $\mu$ l

2.1.4. 5 秒間ボルテックスして、スピンドウンする。

2.1.5. Heat lid を 75°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。

**37°C で 5 ~ 30 分間 (反応時間はステップ 2.1. で設定)**

**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。

## 2.2. アダプターライゲーション

2.2.1. 以下の試薬を FS Reaction Mixture に追添加する。

試薬	添加量
FS Reaction Mixture (ステップ 2.1.5.)	35 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Adaptor for Illumina*	2.5 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Ligation Enhancer	1 $\mu$ l
● (赤色) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix**	30 $\mu$ l
全液量	68.5 $\mu$ l

\* 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、数回ピペッ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。**

2.2.2. 100  $\mu$ l または 200  $\mu$ l のピペットを 50  $\mu$ l 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 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)。

2.2.3. 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。

2.2.4. ライゲーション反応液 (ステップ 2.2.3.) に、● (赤色) USER Enzyme 3  $\mu$ l を追添加する。

**注意: ステップ 2.2.4. および 2.2.5. 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。

2.2.5. ピペッティングし、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

## 2.3. アダプター付加 DNA のサイズセレクション

### 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 2.3.1 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 2.3.1. ~ 2.3.16. では 200 bp の場合を記載。

表 2.3.1：各サイズのセレクションに使用するビーズ量

ライブラリー パラメーター	インサートのサイズ	150 ~ 250 bp	200 ~ 350 bp	275 ~ 475 bp	350 ~ 600 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 ~ 370 bp	320 ~ 470 bp	400 ~ 600 bp	470 ~ 800 bp
ビーズ液量 ( $\mu$ l)	1 回目ビーズ液量	40	30	25	20
	2 回目ビーズ液量	20	15	10	10

- 2.3.1. アダプターライゲーション反応溶液（ステップ 2.2.5.）に、28.5  $\mu$ l の 0.1X TE（1X TE Buffer を水で 10 倍希釈）を加えて 100  $\mu$ l にする。
- 2.3.2. 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。
- 2.3.3. 再懸濁したビーズ 40  $\mu$ l（ $\sim$ 0.4X）をステップ 2.3.1. の溶液に添加する。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！

- 2.3.4. 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。

- 2.3.5. 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。
- 2.3.6. 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。
- 2.3.7. 再度懸濁した SPRIselect または NEBNext Sample Purification Beads の 20  $\mu$ l（ $\sim$ 0.2X）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。
- 2.3.8. 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。
- 2.3.9. 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。
- 2.3.10. 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  $\mu$ 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。
- 2.3.11. ステップ 2.3.10. 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。

2.3.12. 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。



2.3.13. 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 17  $\mu$ 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。

2.3.14. 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！

2.3.15. 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する。5 分後（または溶液が透明になったら）、上清の 15  $\mu$ l を新しい PCR チューブに移す。

2.3.16. ステップ 2.4. のアダプター付加 DNA の PCR 増幅に進む。



**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。

## 2.4. 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、ステップ 2.4.1A. 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、ステップ 2.4.1B. 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

2.4.1. 使用するインデックスプライマーの種類によって、2.4.1A. または 2.4.1B. を選択する。  
滅菌済みストリップチューブに以下の構成成分を添加する。

### 2.4.1A. 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 2.3.16.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index Primer/i7 Primer <sup>**</sup> <sup>***</sup>	5 µl
● (青色) Universal PCR Primer/i5 Primer <sup>*</sup> <sup>****</sup>	5 µl
全液量	50 µl

### 2.4.1B. 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 2.3.16.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index/Universal Primer <sup>****</sup>	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。

2.4.2. 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。

2.4.3. 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 2.4.1 を参考にしながら、量だけで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 2.4.2 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 秒間	1
変性	98°C	10 秒間	3 ~ 7*
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	∞	

\* 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 2.4.1: 一般的なライブラリー調製の推奨サイクル数

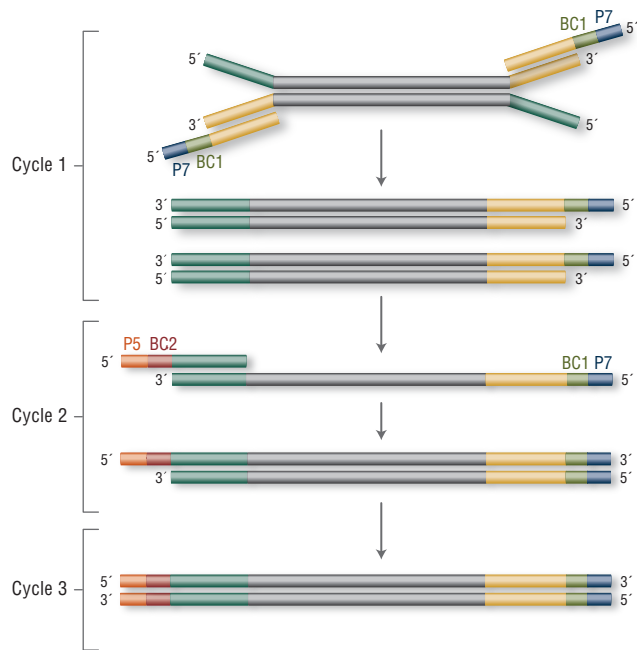
インプット DNA	~ 100 ng (5 ~ 35 nM) のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
500 ng	3**
200 ng	3 ~ 4
100 ng	4 ~ 5

\* サイクル数は、サイズセレクションをしたライブラリー調製で検証。  
 \*\* NEBNext アダプターには P5/P7 配列が含まれず、これらは PCR 中にプライマーから付加される。そのため、最低 3 サイクルの PCR が必要である (右図参照)。

表 2.4.2: ターゲット濃縮に必要なサイクル数

インプット DNA	~ 750 ng ~ 1 µg のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
500 ng	4 ~ 5
200 ng	5 ~ 6
100 ng	6

\* サイクル数は、サイズセレクションをしたライブラリー調製で検証。



Cycle 1: P7 配列とバーコード配列 1 を付加  
 Cycle 2: P5 配列とバーコード配列 2 を付加  
 Cycle 3: 完全長のライブラリーを増幅

2.4.4. ステップ 2.5. の PCR 増幅産物のクリーンアップに進む。

## 2.5. 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。

- 2.5.1. 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 を使用する場合は、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。
- 2.5.2. 再懸濁したビーズ 45  $\mu$  (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！

- 2.5.3. サンプルを静置して、5 分以上、室温でインキュベーションする。
- 2.5.4. チューブまたはプレートに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。
- 2.5.5. 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。
- 2.5.6. 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  $\mu$  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。
- 2.5.7. ステップ 2.5.6. 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。
- 2.5.8. 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。



- 2.5.9. 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  $\mu$  l の 0.1X TE（1X TE を純水で 10 倍希釈）を添加してターゲット DNA を溶出する。
- 2.5.10. 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。
- 2.5.11. 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  $\mu$  l を新しい PCR チューブに移す。これがイルミナシーケンサー用ライブラリーである。ライブラリーは  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存できる。

### 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、 $-20^{\circ}\text{C}$  で安定保存が可能。

## 2.6. Bioanalyzer によるライブラリーの品質検証

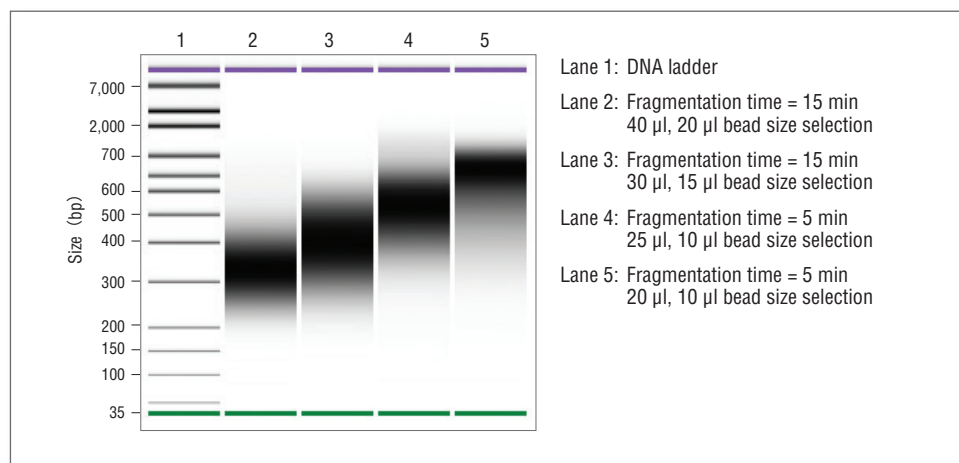
2.6.1. ステップ 2.5.11. のライブラリーを 0.1X TE Buffer で 5 倍希釈する。

2.6.2. 1  $\mu$ l の希釈ライブラリーを Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA チップにアプライして、サイズ分布を確認する。

**注意：**ライブラリーサイズは、断片化 DNA サイズにアダプターとプライマーが付加したサイズになる (+ 120 bp)。

**注意：**目的ピーク以外に ~ 80 bp (プライマー) や 128 bp (アダプターダイマー) のピークが観察された場合、再精製してこれらを除去することを推奨する (フローセルに結合するため)。0.1X TE Buffer を使用してライブラリー容量を 50  $\mu$ l にして、ステップ 2.5. のクリーンアップを行う。

図 2.2：断片化時間とライブラリーサイズ (ヒト DNA : NA 19240 での検証例)



## Section 3

# 大きなサイズ (> 550 bp) のライブラリー調製プロトコール

インプット量およびライブラリーサイズによって下記セクションから選択する：

インプット量が  $\leq 100$  ng → Section 1

インプット量が  $\geq 100$  ng → Section 2

大きなサイズ (> 550 bp) の場合 → Section 3

### 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 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。

**インプット DNA**：100 ng ~ 500 ng のゲノム DNA (未切断) を使用する。DNA は 1X TE (10 mM Tris pH 8.0、1 mM EDTA) に溶解しておく。低濃度 EDTA の 10 mM Tris (pH7.5 ~ 8.0) あるいは水に溶解した DNA でも良い。DNA 液量が 26  $\mu$ l 未満の場合は、キット付属の TE を加えて最終液量を 26  $\mu$ l とする。

### TIPS

- DNA サンプルは RNase などで RNA 除去をしておく
- 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

### 3.1. 断片化&エンドプレップ (末端処理)

3.1.1. Ultra II FS Reaction Buffer を完全に融解する。もし沈殿や結晶が見られる場合 (主にマグネシウム)、ピペティングでこれらをできる限り細かくして、ボルテックスする。使用まで氷上で保存する。仮に沈殿や結晶が残存していても性能には影響ない。

3.1.2. Ultra II FS Enzyme Mix を 5 ~ 8 秒間ボルテックスして氷上で保存する。

**注意：Enzyme Mix は必ずボルテックスで混合する。混合が不十分な場合は断片化効率が低下する。**

3.1.3. 0.2 ml PCR チューブに以下の試薬を添加する。

試薬	1 ライブラリーあたりの添加量
DNA	26 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	7 $\mu$ l
● (黄色) NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	2 $\mu$ l
全液量	35 $\mu$ l

3.1.4. 5 秒間ボルテックスして、スピンドウンする。

3.1.5. Heat lid を 75°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。

**37°C で 5 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。

## 3.2. アダプターライゲーション

3.2.1. 以下の試薬を FS Reaction Mixture に追添加する。

試薬	添加量
FS Reaction Mixture (ステップ 3.1.5.)	35 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	68.5 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、数回ピペッ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。**

3.2.2. 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）。

3.2.3. 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。

3.2.4. ライゲーション反応液（ステップ 3.2.3.）に、● (赤色) USER Enzyme 3 µl を追添加する。

**注意：ステップ 3.2.4. および 3.2.5. 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。

3.2.5. ピペッティングし、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

### 3.3. アダプター付加 DNA の > 550 bp のサイズセレクション

#### 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。

- 3.3.1. アダプターライゲーション反応溶液（ステップ 3.2.5.）に、28.5  $\mu$ l の 0.1X TE（1X TE Buffer を水で 10 倍希釈）を加えて 100  $\mu$ l にする。
- 3.3.2. 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。
- 3.3.3. 再懸濁したビーズ 40  $\mu$ l（ $\sim$ 0.4X）をステップ 3.3.1. の溶液に添加する。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！

- 3.3.4. 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。

- 3.3.5. チューブまたはプレートに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。
- 3.3.6. 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 が結合している。上清には目的よりも小さい DNA 断片が残っている。
- 3.3.7. 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  $\mu$ 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。
- 3.3.8. ステップ 3.3.7. 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。
- 3.3.9. 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。



- 3.3.10. 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 102  $\mu$ 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。
- 3.3.11. 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！

- 3.3.12. 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 100  $\mu$ l を新しい PCR チューブに移す。
- 3.3.13. 懸濁したビーズ 50  $\mu$ l（ $\sim$ 0.5 X）をステップ 3.3.12. の溶液に添加する。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！

- 3.3.14. 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。

- 3.3.15. 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。

- 3.3.16. 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 が結合している。上清には目的よりも小さい DNA 断片が残っている。
- 3.3.17. 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  $\mu$ 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。
- 3.3.18. ステップ 3.3.17. 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。必要に応じてスピンドウンして、マグネット上に戻し、p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
- 3.3.19. 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。



- 3.3.20. 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  $\mu$ 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。
- 3.3.21. 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！

- 3.3.22. 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  $\mu$ l を新しい PCR チューブに移す。
- 3.3.23. ステップ 3.4. のアダプター付加 DNA の PCR 増幅に進む。




**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。

### 3.4. 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、ステップ 3.4.1A. 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、ステップ 3.4.1B. 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

3.4.1. 以下のように PCR をセットアップする：

使用するインデックスプライマーの種類によって、3.4.1A. または 3.4.1B. 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。

#### 3.4.1A. 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 3.3.23.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index Primer/i7 Primer <sup>* **</sup>	5 µl
● (青色) Universal PCR Primer/i5 Primer <sup>* ***</sup>	5 µl
全液量	50 µl

#### 3.4.1B. 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 3.3.23.)	15 µl
● (青色) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
● (青色) Index/Universal Primer <sup>****</sup>	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。

3.4.2. 100 µl または 200 µl のピペットを 40 µl にセットし、10 回以上ピペティングして完全に混合して、スピンドウンする。

3.4.3. 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 3.4.1 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 3.4.2 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 秒間	1
変性	98°C	10 秒間	3 ~ 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	∞	

\* 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 3.4.1: 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	~ 100 ng (5 ~ 35 nM) のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
500 ng	3 ~ 4
200 ng	4 ~ 5
100 ng	5 ~ 7

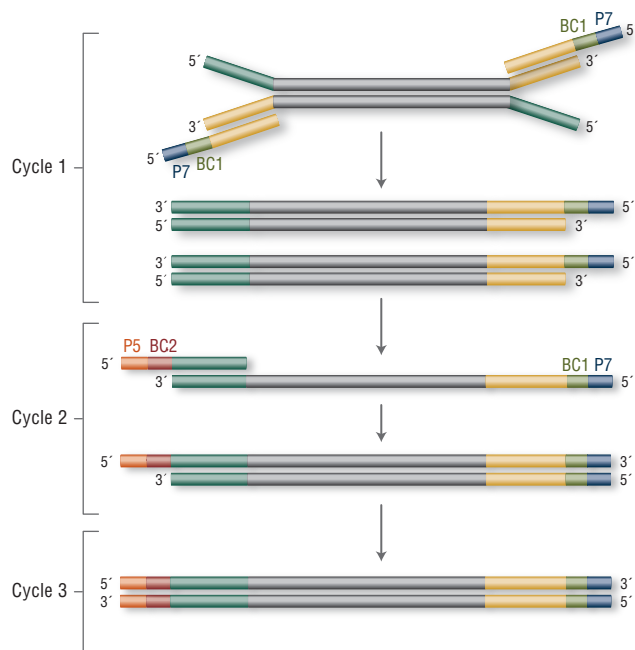
\* サイクル数は、サイズセレクションをしたライブラリー調製で検証。

\*\* NEBNext アダプターには P5/P7 配列が含まれず、これらは PCR 中にプライマーから付加される。そのため、最低 3 サイクルの PCR が必要である (右図参照)。

表 3.4.2: ターゲット濃縮に必要なサイクル数

インプット DNA	~ 1 µg のライブラリー調製に必要なサイクル数 *
500 ng	4 ~ 5
200 ng	5 ~ 6
100 ng	7 ~ 8

\* サイクル数は、サイズセレクションをしたライブラリー調製で検証。



Cycle 1: P7 配列とバーコード配列 1 を付加  
 Cycle 2: P5 配列とバーコード配列 2 を付加  
 Cycle 3: 完全長のライブラリーを増幅

3.4.4. ステップ 3.5. の PCR 増幅産物のクリーンアップに進む。

### 3.5. 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。

- 3.5.1. 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、再懸濁をしてから使用する。
- 3.5.2. 再懸濁したビーズ 30  $\mu$ l (0.6X) 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！

- 3.5.3. 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。
- 3.5.4. 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。
- 3.5.5. 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。
- 3.5.6. 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  $\mu$ 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。
- 3.5.7. ステップ 3.5.6. 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。
- 3.5.8. 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。



- 3.5.9. 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  $\mu$ l の 0.1X TE（1X TE を純水で 10 倍希釈）を添加してターゲット DNA を溶出する。
- 3.5.10. 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。
- 3.5.11. 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  $\mu$ l を新しい PCR チューブに移す。これがイルミナシーケンサー用ライブラリーである。ライブラリーは  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存できる。

#### 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、 $-20^{\circ}\text{C}$  で安定保存が可能。

### 3.6. Bioanalyzer によるライブラリーの品質検証

- 3.6.1. ステップ 3.5.11. のライブラリーを 0.1X TE Buffer で 5 倍希釈する。
- 3.6.2. 1  $\mu$ l の希釈ライブラリーを Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA チップにアプライして測定する。
- 3.6.3. ピークサイズが > 700 bp であることを確認する (図 3.1 参照)。

注意：ライブラリーサイズは、> 550 bp にアダプターとプライマーが付加したサイズになる。

注意：目的ピーク以外に ~ 80 bp (プライマー) や 128 bp (アダプターダイマー) のピークが観察された場合、再精製してこれらを除去することを推奨する (フローセルに結合するため)。0.1X TE Buffer を使用してライブラリー容量を 50  $\mu$ l にして、ステップ 3.5. のクリーンアップを再度行う。

図 3.1：>550 bp のライブラリー調製例 (ヒト DNA : NA 19240 での検証例)。断片化時間は 5 分間、アダプターライゲーション後はクリーンアップを実施 (サイズセレクションではない)

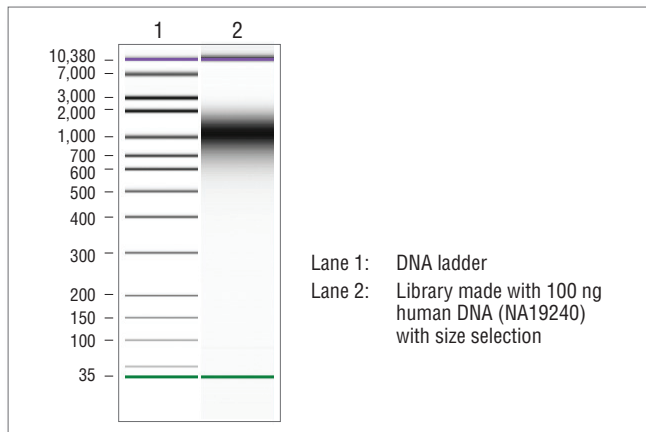
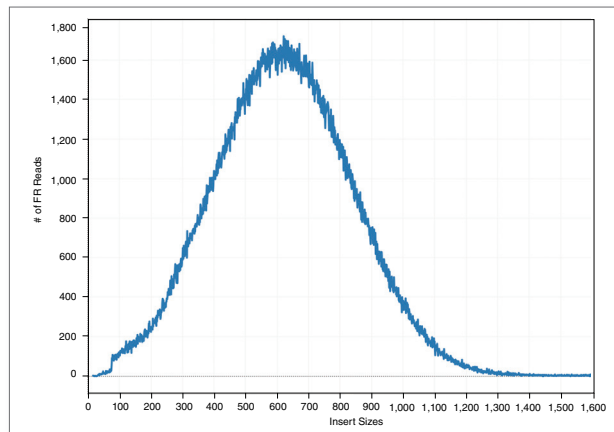


図 3.2：シーケンスリードのサイズ分布例



注意：イルミナ社シーケンサーは小さいサイズの DNA から優先的にクラスター形成を行うため、実際のシーケンスデータのサイズ分布は、BioAnalyzer 測定よりも小さくなる傾向にある (図 3.2 参照)。

> 700 bp のインサートサイズのシーケンスを行う場合、ゲルサイズセレクションを推奨する。

## キットの構成

### NEB #E7805S

NEB #	製品	液量
E7808A	TE Buffer (1X)	1.1 ml
E7807A	NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	0.168 ml
E7806A	NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	0.048 ml
E7648A	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	0.72 ml
E7374A	NEBNext Ligation Enhancer	0.024 ml
E7649A	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	0.6 ml

### NEB #E7805L

NEB #	製品	液量
E7808A	TE Buffer (1X)	4.3 ml
E7807A	NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	0.672 ml
E7806A	NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	0.192 ml
E7648A	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	3 x 0.96 ml
E7374A	NEBNext Ligation Enhancer	0.096 ml
E7649A	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	2 x 1.2 ml

### NEB #E6177S

NEB #	製品	液量
E7808A	TE Buffer (1X)	1.1 ml
E7807A	NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	0.168 ml
E7806A	NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	0.048 ml
E7648A	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	0.72 ml
E7374A	NEBNext Ligation Enhancer	0.024 ml
E7649A	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	0.6 ml
E6178S	NEBNext Sample Purification Beads	3.6 ml

### NEB #E6177L

NEB #	製品	液量
E7808AA	TE Buffer (1X)	4.3 ml
E7807AA	NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	0.672 ml
E7806AA	NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	0.192 ml
E7648AA	NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	3 x 0.960 ml
E7374AA	NEBNext Ligation Enhancer	0.096 ml
E7649AA	NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	2 x 1.2 ml
E6178L	NEBNext Sample Purification Beads	4 x 3.6 ml

## 改訂履歴：

改訂番号	内容	目付
1.0	無し	2017/8
2.0	New formatted manual	2020/4
2.1	Updated product license information	2020/5
2.2	Added hyperlink to “Required Materials Not Included”	2020/6
3.0	プロトコルをアップデート	2022/9
4.0	Updated information on UMI adaptors. Also updated table formatting and legal footnote.	2023/7



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<sup>®</sup>、NEB<sup>®</sup>、NEBNext<sup>®</sup>、USER<sup>®</sup> は、New England Biolabs, Inc. の商標または登録商標です。

ILLUMINA<sup>®</sup> and TRUSEQ<sup>®</sup> are registered trademarks of Illumina, Inc.

COVARIS<sup>®</sup> is a registered trademark of Covaris, Inc.

AGILENT<sup>®</sup> and BIOANALYZER<sup>®</sup> are registered trademark of Agilent Technologies, Inc.

AMPURE<sup>®</sup> and SPRISELECT<sup>®</sup> are registered trademarks of Beckman Coulter, 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