

EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina

제품설명서

Cat. EZ034A EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index A Kit)

Cat. EZ034B EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index B Kit)

For research use only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.

목 차

I. 제품 설명	3
II. 제품 구성 및 index 정보	4
III. 실험 방법	7
IV. 간편 설명서.....	11

I. 제품 설명

Enzynomics 의 EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit 는 차세대 염기서열분석을 위한 DNA sample 의 library 제작에 필요한 모든 구성을 갖춘 제품으로 350 bp 와 550 bp 크기의 insert DNA 를 사용하는 whole-genome resequencing 에 최적화되었습니다. 이 제품은 index 종류에 따라 A, B kit 로 구성되어 각각 24 개 sample 에 사용 가능하며 master-mix 형태의 효소를 제공함으로써 제품 구성을 간소화하고 효율성을 높였습니다. Library 제작을 위해 DNA fragment 양쪽 말단에 index adaptor 를 연결하여 증폭하는 과정에서 단계별 fragment 크기 선별과 정제를 위한 bead 가 제품에 포함되어 있습니다. 제작된 library 로 single-read 또는 paired-end 염기서열분석을 수행할 수 있습니다.

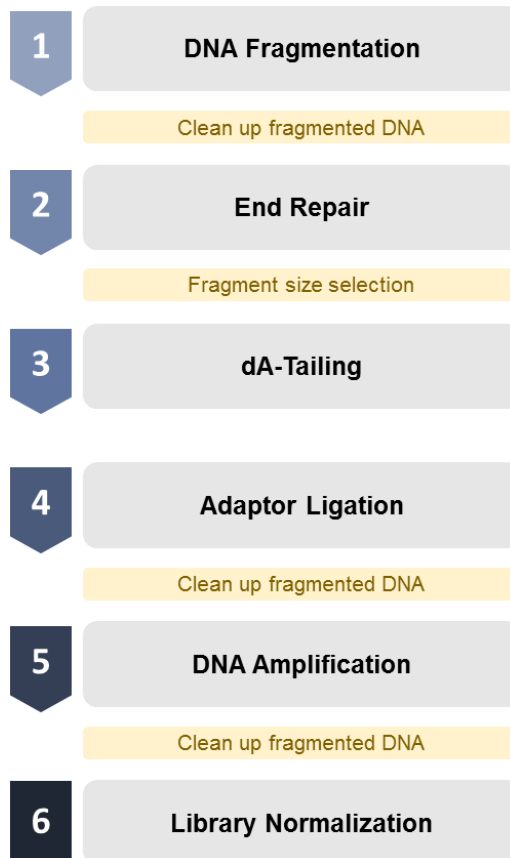


그림 1. Library 제작 과정 모식도

II. 제품 구성 및 index 정보

제품명	Cat. #	Sample 수	Index 수
EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index A Kit)	EZ034A	24	12
EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index B Kit)	EZ034B	24	12

1. Box 1 (-20℃ 보관)

1) EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index A Kit)

구성품	용량
End Repair Mix	1 ml
dA-Tailing Mix	0.7 ml
Adaptor Ligation Mix	0.14 ml
Stop Ligation Buffer	0.5 ml
PCR Primer Cocktail	0.35 ml
Enhanced PCR Mix	0.55 ml
DNA Adaptor Index 2	0.05 ml
DNA Adaptor Index 4	
DNA Adaptor Index 5	
DNA Adaptor Index 6	
DNA Adaptor Index 7	
DNA Adaptor Index 12	
DNA Adaptor Index 13	
DNA Adaptor Index 14	
DNA Adaptor Index 15	
DNA Adaptor Index 16	
DNA Adaptor Index 18	
DNA Adaptor Index 19	

2) EZ-Seq™ Nano DNA Library Prep Kit (Index B Kit)

구성품	용량
End Repair Mix	1 ml
dA-Tailing Mix	0.7 ml
Adaptor Ligation Mix	0.14 ml
Stop Ligation Buffer	0.5 ml
PCR Primer Cocktail	0.35 ml
Enhanced PCR Mix	0.55 ml
DNA Adaptor Index 1	0.05 ml
DNA Adaptor Index 3	
DNA Adaptor Index 8	
DNA Adaptor Index 9	
DNA Adaptor Index 10	
DNA Adaptor Index 11	
DNA Adaptor Index 20	
DNA Adaptor Index 21	
DNA Adaptor Index 22	
DNA Adaptor Index 23	
DNA Adaptor Index 25	
DNA Adaptor Index 27	

2. Box 2 (4°C 보관)

구성품	용량
Resuspension Buffer	20 ml
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	10 ml

3. Index 염기서열 정보

Index A Kit		Index B Kit	
Index 2	CGATGTA	Index 1	ATCACGA
Index 4	TGACCAA	Index 3	TTAGGCA
Index 5	ACAGTGA	Index 8	ACTTGAA
Index 6	GCCAATA	Index 9	GATCAGA
Index 7	CAGATCA	Index 10	TAGCTTA
Index 12	CTTGTA	Index 11	GGCTACA
Index 13	AGTCAAC	Index 20	GTGGCCT
Index 14	AGTTCCG	Index 21	GTTTCGG
Index 15	ATGTCAG	Index 22	CGTACGT
Index 16	CCGTCCC	Index 23	GAGTGGA
Index 18	GTCCGCA	Index 25	ACTGATA
Index 19	GTGAAAC	Index 27	ATTCCTT

III. 실험 방법

1. DNA 준비

- 350 bp insert 용으로는 100 ng, 550 bp insert 용으로는 200 ng 의 genomic DNA 를 52.5 μ l 에 준비합니다.
- Sonicator 의 사용법에 따라 genomic DNA 를 fragmentation 합니다. 생성된 DNA fragment 는 3' 또는 5' overhang 말단을 갖습니다. Sonication 후 50 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.
- **Magnetic bead 를 사용하여 정제 과정을 수행합니다.**
 - ① EZ-Pure™ SPRI Bead Mix 를 완전히 혼합된 상태로 준비합니다.
 - ② Fragmentation 된 DNA 50 μ l 에 bead 80 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
 - ③ 상온에서 5 분간 반응합니다.
 - ④ Magnetic stand 에 tube 를 고정하고 sample 이 투명해지면 상층액을 제거합니다.
 - ⑤ Magnetic stand 에 tube 를 고정한 채로 80% ethanol 200 μ l 를 이용하여 2 회 세척합니다.
 - ⑥ Ethanol 이 남아 있지 않도록 상온에 5 분간 건조합니다.
 - ⑦ Resuspension Buffer 62.5 μ l 를 넣고 vortexing 후 2 분간 반응합니다.
 - ⑧ 280 x g 에서 1 분간 원심분리한 후, magnetic stand 에 고정하여 투명해지면 상층액 60 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.

2. End Repair

- 준비된 DNA 60 μ l 에 End Repair Mix 40 μ l 를 넣고 잘 혼합한 후 30°C 에서 30 분간 반응합니다.
- **Magnetic bead 를 사용하여 fragment 크기 선별 과정을 수행합니다.**

〈큰 크기의 fragment 제거 단계〉

- ① EZ-Pure™ SPRI Bead Mix 를 완전히 혼합된 상태로 준비합니다.
- ② 아래와 같은 비율로 sample 당 bead 를 희석합니다.

Bead 희석	350 bp insert	550 bp insert
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	109.25 μ l	92 μ l
PCR grade water	74.75 μ l	92 μ l
Total volume	184 μ l	184 μ l

- ③ End repair 반응액 100 μ l 에 희석된 bead 160 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
- ④ 상온에서 5 분간 반응합니다.
- ⑤ Magnetic stand 에 tube 를 고정하고 sample 이 투명해지면 상층액 250 μ l 를 새 tube 에 옮기고 남아 있는 bead 는 버립니다.

<작은 크기의 fragment 제거 단계>

- ① 앞서 분리된 상층액 250 μ l 에 희석되지 않은 bead 30 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
- ② 상온에서 5 분간 반응합니다.
- ③ Magnetic stand 에 tube 를 고정하고 sample 이 투명해지면 상층액을 제거합니다.
- ④ Magnetic stand 에 tube 를 고정한 채로 80% ethanol 200 μ l 를 이용하여 2 회 세척합니다.
- ⑤ Ethanol 이 남아 있지 않도록 상온에 5 분간 건조합니다.
- ⑥ Resuspension Buffer 20 μ l 를 넣고 vortexing 후 2 분간 반응합니다.
- ⑦ 280 x g 에서 1 분간 원심분리한 후, magnetic stand 에 고정하여 투명해지면 상층액 17.5 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.

※ 중지 가능지점) 본 단계에서 실험을 중지할 경우 -20°C 에서 7 일간 보관 가능합니다.

3. dA-Tailing

- End repair 된 DNA 17.5 μ l 에 dA-Tailing Mix 12.5 μ l 를 넣고 잘 혼합하여 37°C 에서 30 분간 반응합니다.
- 반응 종단을 위해 70°C 에서 5 분간 반응합니다.

4. Adaptor Ligation

- dA-Tailing 된 DNA 30 μ l 에 Resuspension Buffer 2.5 μ l, Adaptor Ligation Mix 2.5 μ l, DNA Adaptor 2.5 μ l 를 넣어 잘 혼합한 후, 30°C 에서 10 분간 반응합니다.
- Stop Ligation Buffer 5 μ l 를 넣어 반응을 중단합니다. 총 반응액은 42.5 μ l 가 됩니다.
- **Magnetic bead** 를 사용하여 정제 과정을 2 회 수행합니다.
 - ① EZ-Pure™ SPRI Bead Mix 를 완전히 혼합된 상태로 준비합니다
 - ② 반응액 42.5 μ l 에 bead 42.5 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
 - ③ 상온에서 5 분간 반응합니다.
 - ④ Magnetic stand 에 tube 를 고정하고 sample 이 투명해지면 상층액을 제거합니다.
 - ⑤ Magnetic stand 에 tube 를 고정한 채로 80% ethanol 200 μ l 를 이용하여 2 회 세척합니다.
 - ⑥ Ethanol 이 남아 있지 않도록 상온에 5 분간 건조합니다.
 - ⑦ Resuspension Buffer 52.5 μ l 를 넣고 vortexing 후 2 분간 반응합니다.
 - ⑧ 280 x g 에서 1 분간 원심분리한 후, magnetic stand 에 고정하여 투명해지면 상층액 50 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.
 - ⑨ 상층액 50 μ l 에 bead 50 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
 - ⑩ ③~⑥ 과정을 반복합니다.
 - ⑪ Resuspension Buffer 27.5 μ l 를 넣고 vortexing 후 2 분간 반응합니다.
 - ⑫ 280 x g 에서 1 분간 원심분리한 후, magnetic stand 에 고정하여 투명해지면 상층액 25 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.

※ 중지 가능지점) 본 단계에서 실험을 중지할 경우 -20°C 에서 7 일간 보관 가능합니다.

5. DNA Amplification

- Adaptor ligation 된 DNA 25 μ l 에 PCR Primer Cocktail 5 μ l, Enhanced PCR Mix 20 μ l 를 넣고 혼합하여 아래와 같은 조건으로 PCR 을 수행합니다.

온도	시간	Cycle 수
98°C	3 분	-
98°C	20 초	8
60°C	15 초	
72°C	30 초	
72°C	5 분	-
12°C	∞	-

- Magnetic bead 를 사용하여 정제 과정을 수행합니다.
 - EZ-Pure™ SPRI Bead Mix 를 완전히 혼합된 상태로 준비합니다
 - 반응액 50 μ l 에 bead 50 μ l 를 넣고 pipette 을 이용하여 혼합합니다.
 - 상온에서 5 분간 반응합니다.
 - Magnetic stand 에 tube 를 고정하고 sample 이 투명해지면 상층액을 제거합니다.
 - Magnetic stand 에 tube 를 고정한 채로 80% ethanol 200 μ l 를 이용하여 2 회 세척합니다.
 - Ethanol 이 남아 있지 않도록 상온에 5 분간 건조합니다.
 - Resuspension Buffer 32.5 μ l 를 넣고 vortexing 후 2 분간 반응합니다.
 - 280 x g 에서 1 분간 원심분리한 후, magnetic stand 에 고정하여 투명해지면 상층액 30 μ l 를 새 tube 에 옮깁니다.

※ 중지 가능지점) 본 단계에서 실험을 중지할 경우 -20°C 에서 7 일간 보관 가능합니다.

IV. 간편 설명서

1. DNA 준비

- ① 분석하고자 하는 insert 크기에 따라 genomic DNA 를 아래와 같이 준비하여 파쇄합니다.

Insert 크기	350 bp	550 bp
Genomic DNA 양	100 ng	200 ng
Sample 양	52.5 μ l	52.5 μ l
파쇄 후 회수량	50 μ l	50 μ l

- ② Magnetic bead 를 사용하여 정제합니다. (6 페이지 상세 설명 참고)

DNA	50 μ l
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	80 μ l
Total volume	130 μ l
→ 5 분간 반응 후 80% ethanol 2 회 세척	
Resuspension Buffer	62.5 μ l
회수량	60 μ l

2. End Repair

- ① 아래와 같이 반응합니다.

Fragmented DNA	60 μ l
End Repair Mix	40 μ l
Total volume	100 μ l
반응 조건	30°C, 30 분

- ② Magnetic bead 를 사용하여 fragment 크기를 선별합니다. (7 페이지 상세 설명 참고)

※ 아래와 같은 비율로 sample 당 bead 를 희석합니다.

Bead 희석	350 bp insert	550 bp insert
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	109.25 μ l	92 μ l
PCR grade water	74.75 μ l	92 μ l
Total volume	184 μ l	184 μ l

※ 큰 크기의 fragment 제거

End Repaired DNA	100 μ l
희석된 EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	160 μ l
Total volume	260 μ l
회수량	250 μ l

※ 작은 크기의 fragment 제거

회수된 상층액	250 μ l
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	30 μ l
Total volume	280 μ l

→ 5 분간 반응 후 80% ethanol 2 회 세척

Resuspension Buffer	20 μ l
회수량	17.5 μ l

3. dA-Tailing

① 아래와 같이 반응합니다.

End Repair, purified DNA	17.5 μ l
dA-Tailing Mix	12.5 μ l
Total volume	30 μ l
반응 조건	37°C, 30 분 후 70°C, 5 분

4. Adaptor Ligation

① 아래와 같이 반응합니다.

dA-Tailed DNA	30 μ l
Adaptor Ligation Mix	2.5 μ l
DNA Adaptor	2.5 μ l
Resuspension Buffer	2.5 μ l
Total volume	37.5 μ l
반응 조건	30°C, 10 분
(반응 중단) Stop Ligation Buffer	5 μ l (Total volume 42.5 μ l)

- ② Magnetic bead 를 사용하여 2 회 정제합니다. (8 페이지 상세 설명 참고)

구분	1 차 정제	2 차 정제
DNA	42.5 μ l	50 μ l
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	42.5 μ l	50 μ l
Total volume	85 μ l	100 μ l
→ 5 분간 반응 후 80% ethanol 2 회 세척		
Resuspension Buffer	52.5 μ l	27.5 μ l
회수량	50 μ l	25 μ l

5. DNA Amplification

- ① 아래와 같이 혼합한 후 PCR 을 수행합니다.

반응 조성	용량
Adaptor ligated, purified DNA	25 μ l
PCR Primer Cocktail	5 μ l
Enhanced PCR Mix	20 μ l
Total volume	50 μ l

- ② 아래와 같이 PCR 반응을 실시합니다.

온도	시간	Cycle 수
98°C	3 분	-
98°C	20 초	8
60°C	15 초	
72°C	30 초	
72°C	5 분	-
12°C	∞	-

- ③ Magnetic bead 를 사용하여 정제합니다. (9 페이지 상세 설명 참고)

PCR product	50 μ l
EZ-Pure™ SPRI Bead Mix	50 μ l
Total volume	100 μ l
→ 5 분간 반응 후 80% ethanol 2 회 세척	
Resuspension Buffer	32.5 μ l
회수량	30 μ l

※ 책임의 한계

Enzynomics 는 어떠한 경우에도 본 제품의 사용, 사용 결과 또는 본 제품을 사용하지 못함으로 인해 발생하는 직접, 간접, 파생적 또는 부수적 손해에 대한 책임을 지지 않습니다.