

アジレント SureSelect ターゲットエンリッチメントシステム
 イルミナ インデックスカスタムキットに必要なもの (ペアエンド:マルチプレックス)
 プロトコル Version 1.0対応

2010年5月18日

Human All Exon (plus)キットと通常のカスタムキットは必要なものが異なります。別途専用の必要なもののリストを参照ください。

この必要なもののリストは、gDNAを断片化してアダプタを付けてから、SureSelect試薬を用いて、ターゲット領域をキャプチャ、濃縮するまでの過程に必要な試薬と器具類をまとめたものです。シーケンシングに必要な物は、イルミナ社にお問い合わせください。

※指定:必ず指定されたものをご使用ください。指定品以外を使用された場合は保証の対象外になります。
 ※推奨:安定した結果を得るために、推奨品の使用をお奨めします。推奨品以外の製品を使用された場合、アプリケーションサポートの対象外になります。
 ※相当:コメント欄に記載された条件を満たすものなら、何を使用されてもかまいません。

<必要な試薬類>

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	必要量/1反応あたり	内容量	備考
SureSelect Target Enrichment, MP, イルミナGAインデックス対応	Agilent	eArrayでオーダーしたELIDと納品されたライブラリのELIDが同じであることを確認してください。	-	1		
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Stratagene	600677	指定	2 uL/反応	200 uL	dNTP溶液付きのタイプが必要です。大容量タイプ(600679,400 uL)もあります。
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	2 ラン	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1ラン	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。エキスパートソフトウェアVer B02.07以降が必要です
Agilent QPCR NGSライブラリ定量キット(イルミナGA)	Agilent	G4880A	推奨	1ラン	5ラン分	1ランで最大21サンプルまで定量することができます。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Invitrogen (ベリタス)	65601	指定	50 uL/反応	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
illumina Paired End DNA Sample Prep Kit	illumina	PE-102-1001	指定	1	10反応分	ペアエンド法
illumina Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit	illumina	PE-400-1001	指定	1index分	12 index x 8レーン分	Multiplexを行う場合、8レーンすべてをMultiplexシーケンスする必要があります
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880 または A63881 または A63882	指定	900 uL/反応	A63880 - 5 mL x1, A63881 - 60 mL x1 A63882 - 450 mLx1	SureSelect 1反応 合計900 uL 使用
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Applied Biosystems	4389764	相当	約 120 uL	25 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Ambion	AM9930	相当	約 1.4 mL	500 mL	DEPC処理ではないこと
100% Ethanol, molecular biology grade	Sigma Aldrich	E7023	相当			96%以上で、分子生物学用グレード 他の有機溶剤のコンタミネーションがない
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade				3.5 mL		
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit for Qubit fluorometer (recommended)	Invitrogen	Q32850				スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。

※ 各キットについて、それぞれの大容量タイプはご利用いただけます。

<必要な機器、消耗品類>

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	必要量	備考
Covaris S-series Single Tube Sample Preparation System, Model S2	Covaris (エムエス機器)	Model S2	指定		Model E210, C-2000でも可能、gDNAを再現性良く断片化するために必要。ネプライザの使用は推奨しません。
Covaris microTUBE with AFA fiber and snap cap	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		Model S2用
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2938C	指定		キャプチャ前後のDNAライブラリの定量とサイズ確認に必要です。Expert Control Software B.02.07以降のversionであること
Qubit fluorometer	Invitrogen	Q32857	推奨		スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
サーマルサイクラー	Applied Biosystems	Verity Thermal Cyclor	相当		65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと (HotTop使用)
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		
旋回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV-03	相当		磁気ビーズ溶液がチューブを上下してよく混ざるように、旋回運動をするタイプのもの 別売りの専用チューブラック (WEB-03-12)と組み合わせると便利
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当		45°C以下の低温で、50uLのDNA溶液 (EBバッファ溶液)が1~2時間程度で濃縮できること。専用ロータ、冷却トラップTU-500と油回転真空ポンプGLD-051が必要です。
Dynal DynaMag-2	Invitrogen	123-21D	相当		1.5 - 2mL 遠心チューブ 16本立ての磁気ビーズ用磁石スタンド
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plates またはoptical strip tubes	Agilent	410088 または 401428	相当	Plate2枚 Strip Tubes Strip Tube 4 連 120本 PCR Plate 25プレート	65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	相当	キャップ4連 strip caps 120本	65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと-HotTop対応のこと
MicroAmp Clear Adhesive Film	Applied Biosystems	4306311	相当	4枚 100 films	PCRの機種によっては、Stripキャップのかわりにシールを用いることもできますが、より液が蒸発しやすくなる場合があるので、使用には十分な注意とテストが必要です。65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと-HotTop対応のこと
Tube-strip capping tool	Agilent	410099	相当		PCRチューブのキャップを確実に密閉するために便利なツールです。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当	約28本 250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用してください。
Nuclease Free 0.2mL PCRチューブ (thin-walled)	Eppendorf	95262-0030 108.051	相当	約8本 1000本	
Qubit assay tubes	Invitrogen	Q32856			QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
ピペット	Pipetman	P10,P20,P200,P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体に対して同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアロゾルブロックフィルター付き					
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当		
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly・Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当		
アイスバケツ					
タイマー					
ボルテックスミキサー					
卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII	相当		
ヒートブロック(37°C)、1.5mLのチューブが入るタイプ					AM Pure XPビーズによる精製ステップで使用します。
ウォータバス (WashBuffer2のPreWarm 65°C)			相当		
オプション品となります。必要に応じてご利用ください					
Mx3005P リアルタイム定量PCRシステム	Agilent	401449	相当		キャプチャされたDNAライブラリを正確に定量するために用います。

<問い合わせ先>アジレント・テクノロジー株式会社