

アジレント SureSelect^{XT} Methyl-Seq 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(マルチプレックス)シーケンスに必要なもの (ペアエンド)
プロトコル Version B 対応

2013年2月21日

この必要なものリストは、gDNAのQCおよび断片化の後、SureSelect Methyl-Seq試薬を用いて、メチル化アダプタを付加し、メチル化ターゲット領域をキャプチャ、濃縮するまでの過程で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ものは、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。指定品以外を使用し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した場合、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/相当品	必要量/1反応あたり	内容量	備考
SureSelect ^{XT} Human Methyl-Seq Capture Library, 16 reactions	Agilent	5190-4661	-	1	16反応分	16反応分
SureSelect ^{XT} Human Methyl-Seq Capture Library, 96 reactions	Agilent	5190-4662	-	1	96反応分	96反応分
SureSelect ^{XT} Methyl-Seq Reagent Kit, 16 reactions	Agilent	G9651A	-	1	16反応分	16反応分
SureSelect ^{XT} Methyl-Seq Reagent Kit, 96 reactions	Agilent	G9651B	-	1	96反応分	96反応分
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	2 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	バイサルファイト変換後のライブラリの定量に使用します。この定量値により次のPCRのサイクル数を決定します。1ランで最大21サンプルまで定量することができます。
EZ-DNA Methylation-Gold Kit, 50 reactions	Zymo Research	D5005	指定	1	50反応分	50反応分です。(200反応分もあります。D5006)
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	510 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
MinElute PCR Purification Kit (50)	Qiagen	28004	指定	1	50回分	50回分です。(250回分もあります。28006)
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	4389764	相当	約 50 uL	25 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Ambion	AM9930	相当	約 230 uL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	和光純薬工業	054-07225	相当	約 6 mL	500mL	96%以上、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こと
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade				2.8 mL		
3M酢酸ナトリウム (pH5.0) 分子生物学用	和光純薬工業 (SERVA)	39572.01	相当	約 10 uL	250 mL	MinEluteカラムによる精製ステップが必要になる場合があります。和光純薬工業 (SERVA)の表記製品はpH5.2となります。
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	推奨		100 assay	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。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
Agilent 2200 TapeStation消耗品						
D1K ScreenTape キット	Agilent	5067-5361	指定	2ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
D1K 試薬キット	Agilent	5067-5362	指定	2ラン		
High Sensitivity D1K ScreenTape キット	Agilent	5067-5363	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
High Sensitivity D1K 試薬キット	Agilent	5067-5364	指定	1ラン		
Genomic DNA ScreenTape キット	Agilent	5067-5365	指定	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	指定	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アカロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。

<必要な機器、消耗品類>

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	備考
SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8800A	推奨		反応液量の最大値が100uLに対応していること、ふた(Hot Top)の温度をオフに出来ること。
96 well plate module for SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8810A	推奨		
Polypropylene 96-Well Tube Plates	Agilent	410088	推奨		25 plates
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	推奨	キャップ4連	strip caps 120本
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	推奨	1本	strip caps 120本
コンプレッション・マット	Agilent	410187	推奨	1枚	10枚
Tube-strip capping tool			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。
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。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent		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 TapeStationをお使いいただくことも可能です。
Covaris Sample Preparation System, E-series	Covaris (エムエス機器)	Model S220 or E220 or LE220	指定		gDNAを再現性良く断片化するために必要。ノブライザの使用は推奨しません。S220はマニュアルで1検体ずつの処理。E210は96検体を自動処理できるが、1検体ずつの処理。LE220は96検体を自動処理できるが、8検体ずつの処理 (E210より8倍処理速度が上がる) LE220はS2やE210と断片化のプロトコルが異なるので要注
Covaris S-series sample holders, microTUBE with AFA fiber and snap cap	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		Model S220用

Covaris E-series sample holders, 96 microTUBE plate	Covaris (エムエス機器)	520078	指定			Model E210用
Qubit fluorometer	Life Technologies	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。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
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ぜるよう、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℃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	Life Technologies	123-21D	相当			磁石スタンド。1.5mLのチューブを使用するAMPureXPビーズによる精製およびStreptavidinビーズの洗浄に使用します
Dynal DynaMag-96 Side Skirted	Life Technologies	120.27	相当			96ウェルプレートを使用してAMPureXPビーズ精製を行う場合に必要です。Strip Tubelには使用できません。1.5mLチューブを使用してAMPureXPビーズ精製を行う場合は不要です。
96-well plate and strip tube compatible magnetic separator	日本ジェネテイクス (Agencourt)	A32782	相当			96ウェルプレートもしくはStrip Tubeを使用してAMPureXPビーズ精製を行う場合に必要です。1.5mLチューブを使用してAMPureXPビーズ精製を行う場合は不要です。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	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℃24hのハイブリッド、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと・HotTop対応のこと。Stripキャップを使用する場合は、不要です。
Nuclease Free 1.5 mL microfuge LoBind tubes	Eppendorf	22431021	相当		500本	核酸の吸着が少なく、且つNuclease Freeであるもの
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℃)、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℃)			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。
2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA または G2965AA				DNAの定性または定量に使用することができます。