



Avida DNA Reagent Kits

イルミナプラットフォーム用ターゲットシーケンシング

ライブラリ調製、ターゲットキャプチャー、インデックス付加 PCR 試薬

[和文プロトコル](#) [2024 年 7 月版 和文]

Version B0 対応

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedure

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2024

本マニュアルのいかなる部分も、米国および国際著作権法に準拠する Agilent Technologies, Inc.からの事前の合意および書面による同意なしに、いかなる形式または手段（電子的保存および検索または他の言語への翻訳を含む）でも複製することはできません。

保証

本書に含まれる資料は「現状有姿」で提供され、将来の改版に際しては、予告なしに変更される可能性があります。さらに、適用法で認められる最大限の範囲で、Agilent は、本書および本書に含まれる情報に関して、明示または黙示を問わず、商品性および特定目的への適合性の黙示の保証を含むがこれらに限定されない、全ての保証を否認します。Agilent は、本書または本書に含まれる情報の提供、使用またはパフォーマンスに関連するエラーまたは偶発的もしくは間接的な損害について責任を負わないものとします。Agilent とユーザーが、本書の内容と矛盾する保証条件を別個の契約書として結んでいる場合は、別個の契約書の保証条件が優先されます。

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、使用プロトコルについて、弊社までお問い合わせいただきますようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の

Avida DNA Reagent Kits For targeted sequencing on the Illumina platform Library preparation, target capture, and indexing Version B0, June 2024 (G9409-90000) に対応しています。

本プロトコルに関するご質問やご意見などございましたら、下記のメールアドレスにご連絡ください。

email_japan@agilent.com

安全上の注意

CAUTION

CAUTION 表示は危険性を示します。正しく実行または遵守されなかった場合に、製品の損傷や重要なデータの損失につながる可能性のある操作手順や方法などを示しています。CAUTION 表示の個所は、その条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

WARNING

WARNING 表示は危険性を示します。操作手順への注意を喚起するもので、この表示を無視して誤った取扱いをすると、人が死亡または重傷を負う可能性が想定される内容を示しています。

WARNING 表示の個所は、条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

本資料は、Avida DNA Reagent Kits を使用して、ターゲットエンリッチしたイルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンシングライブラリを作成するためのプロトコルです。

1. はじめに

この章では、実験をはじめる前に理解する必要がある情報（安全上の注意点、必要な試薬や機器など）について説明しています。必ず実験前にお読みください。

2. ゲノム DNA の断片化

この章では、機械的断片化による gDNA サンプルの断片化について説明しています。gDNA は Avida DNA ワークフローで使用する前に断片化を行う必要があります。

3. PCR-free ライブラリ調製

この章では、PCR-free ライブラリ調製ステップについて説明しています。NGS ライブラリは Unique Molecular Identifiers (UMIs) を含むアダプターを用いて作製されます。

4. ターゲットキャプチャー

この章では、ターゲットキャプチャーについて説明しています。アダプター付加ライブラリはターゲット特異的なパネルでハイブリダイズされます。ハイブリダイゼーション後にターゲットの分子はストレプトアビジンビーズによってキャプチャーされます。

5. インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認

この章では、インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認のセクションについて説明しています。キャプチャーしたライブラリは増幅され、インデックスが付加されます。インデックス付加後のライブラリを分析し、収量と品質の確認を行います。

6. NGS と解析のガイドライン

この章では、ライブラリのシーケンスと解析のガイドラインについて説明しています。シーケンスの実施方法についてはお使いのイルミナプラットフォームのユーザーガイドを参照してください。

7. リファレンス

この章では、試薬キットの内容、インデックスプライマーペア情報、トラブルシューティング、クイックリファレンスプロトコルなどの参照情報を記載しています。

1. はじめに.....	5
イントロダクション.....	6
ワークフローの概要.....	7
操作と安全に関する注意事項.....	8
Avida DNA Kit とパネルの構成.....	10
インプット DNA サンプルと追加に必要な試薬・器具・消耗品.....	11
2. ゲノム DNA の断片化.....	14
Step 1. 断片化の準備.....	15
Step 2. ゲノム DNA の断片化.....	16
3. PCR-free ライブラリ調製.....	17
Step 1. End prep (末端修復と dA 付加).....	18
Step 2. ライゲーション.....	19
Step 3. ライブラリのビーズへの結合.....	20
4. ターゲットキャプチャー.....	22
Step 1. ハイブリダイゼーション.....	23
Step 2. キャプチャービーズの調製.....	25
Step 3. ビーズキャプチャー.....	27
Step 4. キャプチャービーズの洗浄.....	28
5. インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認.....	29
Step 1. インデックス PCR.....	30
Step 2. ライブラリの精製.....	32
Step 3. ライブラリ DNA の品質確認と定量.....	33
6. NGS と解析のガイドライン.....	36
Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール.....	37
Step 2. シーケンスサンプルの調製.....	38
Step 3. シーケンスの開始.....	39
Step 4. NGS データ解析.....	40
7. リファレンス.....	41
キットの内容.....	42
Avida インデックスプライマーペア情報.....	43
Avida カスタム AddOn パネル.....	45
トラブルシューティングガイド.....	46
クイックリファレンスプロトコル.....	47

1. はじめに

イントロダクション.....	6
ワークフローの概要.....	7
操作と安全に関する注意事項.....	8
Avida DNA Kit とパネルの構成.....	10
インプット DNA サンプルと追加で必要な試薬・器具・消耗品.....	11

この章では、実験をはじめる前に理解する必要がある情報（安全上の注意点、必要な試薬や機器など）について説明しています。必ず実験前にお読みください。

N O T E

本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となります点、ご了承ください。

イントロダクション

ゲノムの変化は、がんを含む多くの疾患の原因となります。ターゲットシーケンスは、ゲノムの変化に関わる疾患の解析に広く用いられています。研究および臨床では、特に微量 DNA で疾患関連領域のさまざまなゲノム変化を評価するためのシンプルで高速なワークフロー、かつ超高感度なターゲットシーケンスソリューションに対する需要が高まっています。Avida ターゲットシーケンスは、DNA 量が限られている場合でも、目的領域におけるゲノム情報を得ることを可能とした革新的技術です。この技術は、分子診断において重要性を増しているセルフリーDNA (cfDNA) に特に最適化されています。また、新鮮検体や新鮮凍結検体、FFPE 由来検体から抽出し、断片化したゲノム DNA (gDNA) にも対応しています。シンプルなワークフローと高速ハイブリダイゼーションケミストリーによるアジレントの Avida ターゲットシーケンステクノロジーは、幅広いゲノム変化について、数時間で高感度かつ詳細な DNA 解析を行うことができます。

Avida ターゲットエンリッチメントテクノロジー

Avida ターゲットエンリッチメントテクノロジーの核となるのは、目的の DNA ターゲットを相乗的かつ間接的にキャプチャーするために特別に設計された 3 次元立体構造です。複数のブリッジプローブが同一ターゲットにハイブリダイズし、ビオチン化アンカープローブによって安定化された場合にのみ、DNA の足場が目的のターゲット分子と形成されます (図 1 参照)。単一のビオチン化長鎖プローブを使用する従来のハイブリダイゼーションと比較して、Avida ハイブリダイゼーションは、ブリッジプローブによる非常に短い標的配列であることから、反応はより高速で効率的です。相乗的なハイブリダイゼーションによってインターロック構造を形成し、ストレプトアビジンビーズに結合すると、特異性の高いキャプチャーが行われます。

Avida プローブパネルは、調製済みですぐに使用でき、安定して高い性能を発揮します。

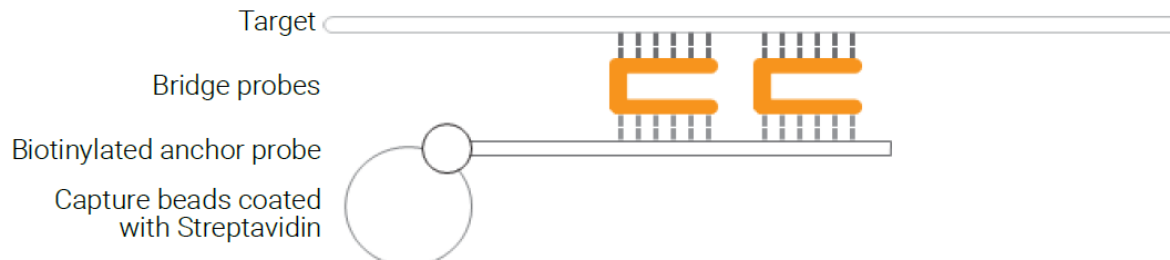


図 1 ブリッジプローブを介したビオチン化アンカープローブへのターゲット配列のハイブリダイゼーション

ワークフローの概要

Avida DNA ワークフローのスタートサンプルはセルフリーDNA (cfDNA) または新鮮検体や新鮮凍結検体および FFPE 検体から抽出し、断片化したゲノム DNA (gDNA) です (スタート DNA サンプルの詳細な必要要件に関しては 11 ページの「[インプット DNA サンプル](#)」を参照してください)。

このワークフローの特徴は PCR-free でライブラリ調製を行い、増幅せずそのままターゲットキャプチャーを行うことでキャプチャー効率、特異性、均一性を最大化している点です。この効率化されたプロトコルによって高いライブラリ複雑性を実現し、高感度でのゲノム変化の検出が可能になりました。

このワークフローは大きく 3 つのセクションに分かれています (表 1 を参照)。全てのプロセスを約 5 時間で完了することができ、出来上がったライブラリはイルミナプラットフォームを用いた次世代シーケンスにすぐに使用することができます。

表 1 ワークフローセクション 1～3 と 8 サンプル処理の場合の所要時間

No.	セクション	説明	所要時間
1	PCR-free ライブラリ調製	末端修復、アダプターライゲーションを行い、cfDNA または断片化 gDNA をアダプター付加された分子へと変換します。	2 時間
2	ターゲットキャプチャー	プローブハイブリダイゼーションと洗浄操作を行い、PCR-free ライブラリから特定のターゲット領域の濃縮を行います。	1.5 時間
3	インデックス PCR と精製	イルミナシーケンスに必要な P5/P7 サンプルインデックスを付加します。	1.5 時間

操作と安全に関する注意事項

コンタミネーション防止のための重要な操作

Avida DNA テクノロジーは高感度のため、コンタミネーションを防止することが非常に重要です。下記の注意点をよく確認してからワークフローを実行してください。

CAUTION

ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルター付きピペットチップを使用してください。

CAUTION

実験工程全体を通して、サンプル間での PCR 産物のコンタミネーションを防ぐため、以下を実施することをお勧めします。

- PCR 前のサンプルを扱う場所と PCR 後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用してください。特に、PCR 後のエリアで使用するものを PCR 前の工程で使用するのは避けて下さい。
- 実験スペースは常にクリーンな状態にしてください。PCR 前の工程では作業台を 10% bleach solution やその相当品により、日常的に清潔に保ってください。
- PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルター付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
- パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。

安全に関する注意

WARNING

実験室で実験を行う際は、各実験室において決められた規則に従い、保護用の用具（白衣、安全眼鏡など）を着用してください。

Biosafety Level 1 (BSL1) のルールに基づき、実験を行います。

操作に関する注意

- PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラーやその他の工程で、キャップの変形が起こり得るため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ビーズの洗浄の工程で複数のサンプルを処理する場合（“4. ターゲットキャプチャー”を参照）
 1. 適切なサイズのリザーバーに事前に試薬を分注してください。
 2. マルチチャンネルのピペットを使用してください。
- **Avida DNA ワークフローではキャプチャー前の増幅ステップがないため、サンプルを扱う際にはチューブやチップ内にサンプルが残っていないことを確認し、サンプルのロスがないようにピPETTINGを行ってください。**
- 磁性ビーズを用いるステップでは上清を完全に除去することが重要です。以下の方法で残存している上清を取り除くようにしてください。
 - チューブ側面にビーズを集めるマグネットスタンドの場合：マグネットスタンドを 5 回ほどタップします。
 - チューブ底にビーズを集めるマグネットスタンドの場合：チューブをマグネットスタンドから取り外し、軽くスピンドウンします。再度マグネットスタンドにチューブをセットし、上清を取り除きます。
- -20°C での保存が必要な試薬は温度に敏感なため、保管と取り扱い時に注意が必要です。できる限り繰り返しの凍結融解を避けるようにしてください。完全に溶けていることを必ず確認してから使用してください。
- 複数のサンプルを処理するために、プロトコルには 10% 余剰分を含んだ試薬の調製量が記載されています。試薬を調製する際には記載されている順序で試薬を加え、ボルテックスで混合後にスピンドウンします。8 または 16 サンプルを処理する際の液量を例として記載しています。
- Stopping point ではサンプルは 4°C あるいは -20°C で保存できます。プロトコル中に記載しています。

1. はじめに

Avida DNA Kitとパネルの構成

Avida DNA 試薬キットに含まれる試薬ボックスを表 2 に記載しています。16 反応キットには 8 サンプルの実験を 2 回行うために、96 反応キットには 16 サンプルの実験を 6 回行うために十分な量の試薬が含まれています。構成内品の試薬リストは「7. リファレンス」内の 42 ページの「キットの内容」に記載しています。

表 3 にはこのプロトコルで使用可能な Avida パネルを記載しています。

表 2 Avida DNA 試薬キット

Avida DNA reagent kits	試薬ボックス	保管温度
P/N G9409A	Avida DNA Reagent Box 1, 16 Reactions	-20°C
Avida DNA Reagent kit (index primer pairs 1-16), イルミナ, 16 反応	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, 16 Reactions	室温
	Avida Beads Box, 16 Reactions	4°C
	Avida Index Primer Pairs 1–16 for ILM	-20°C
P/N G9409B	Avida DNA Reagent Box 1, 16 Reactions	-20°C
Avida DNA Reagent kit (index primer pairs 17-32), イルミナ, 16 反応	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, 16 Reactions	室温
	Avida Beads Box, 16 Reactions	4°C
	Avida Index Primer Pairs 17–32 for ILM	-20°C
P/N G9418A	Avida DNA Reagent Box 1, 96 Reactions	-20°C
Avida DNA Reagent kit (index primer pairs 1-96), イルミナ, 96 反応	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, 96 Reactions	室温
	Avida Beads Box, 96 Reactions	4°C
	Avida Index Primer Pairs 1–96 for ILM	-20°C
P/N G9418B	Avida DNA Reagent Box 1, 96 Reactions	-20°C
Avida DNA Reagent kit (index primer pairs 97-192), イルミナ, 96 反応	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, 96 Reactions	室温
	Avida Beads Box, 96 Reactions	4°C
	Avida Index Primer Pairs 97–192 for ILM	-20°C

表 3 Avida パネル

Capture Probes Panel	Size	Design ID	P/N 16 反応	P/N 96 反応
Avida DNA Discovery Cancer Panel	2.68 Mb	D3496941	5280-0040	5280-0044
Avida DNA Expanded Cancer Panel	345 kb	D3483241	5280-0046	5280-0047
Avida DNA Focused Cancer Panel	26 kb	D3483231	5280-0049	5280-0050

Avidaインデックス配列情報

各 Avida Index Primer Pairs には 8 bp の P5、P7 インデックスが含まれており、デュアルインデックスの NGS ライブラリが作製されます。インデックス配列情報が含まれたスプレッドシートは [Avida Index Resource](#) からダウンロードできます。

このリンクからはウェブサイトは開かれず、エクセルスプレッドシートが自動的に使用しているウェブブラウザの既定のフォルダにダウンロードされます。ファイルは Microsoft Excel またはその他の互換性のあるソフトウェアで開くことができます。スプレッドシートのリンクは Agilent.com 内の [Avida DNA 製品ページ](#) にもございます。最初のタブにスプレッドシートの内容と使用に関するインストラクションが記載されています。

インプットDNAサンプルと追加で必要な試薬・器具・消耗品

インプットDNAサンプル

ワークフローのスタートサンプルとして使用可能な DNA サンプルの条件を表 4 に記載しています。インプット量の範囲は Qubit Assay による定量に基づいています。DNA は 1X Low TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) または Qiagen Elution Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH8.5) で保存できます。DNA はライブラリ調製を行う前に適切な長さに断片化する必要があります。gDNA の場合は 150~300 bp のインサート長を得るために Covaris による断片化を推奨しています (“2. ゲノム DNA の断片化”を参照)。cfDNA は一般的には平均長 170 bp のため、追加の断片化は必要ありません。

表 4 インプット DNA サンプル要件

サンプルタイプ	インプット量	断片化	保存バッファー
cfDNA	1~100 ng*	平均長が 170 bp のため断片化は不要です。	Low TE buffer または Qiagen Buffer EB
新鮮検体や新鮮凍結検体、または FFPE 由来の gDNA	10~100 ng†	インサート長が 150~300 bp となるよう断片化が必要です。	Low TE buffer または Qiagen Buffer EB

*1 ng の cfDNA からライブラリを作成することが可能ですが、インプット量を増やすことで変異検出のパフォーマンスが向上します。

†FFPE 由来のゲノム DNA の場合は範囲内で使用できる限りの量を使用してください。

NOTE

Avida ワークフローは SeraCare 社の Seraseq ctDNA Complete Reference Material および Seraseq ct DNA Reference Material V2 に対応していません。詳細はお問い合わせください。

1. はじめに

追加で必要な試薬・器具・消耗品

ワークフローを実施するために追加で準備する試薬・器具・消耗品を表 5 から表 7 に記載しています。

表 5 必要な試薬

品名	メーカーと型番
99.5% Ethanol, molecular biology grade, 500 mL	Wako p/n 054-07225 または相当品
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific p/n 12090-015 または相当品
(オプション) Qubit dsDNA HS or BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
100 assays	p/n Q32851 (HS) or Q32850 (BR)
500 assays	p/n Q32854 (HS) or Q32853 (BR)
Purification Beads AMPure XP for PCR purification	Beckman Coulter Genomics
5 mL	p/n A63880
60 mL	p/n A63881

表 6 必要な器具

品名	メーカーと型番
サーマルサイクラー (96 ウェル、0.2mL ブロック)	相当品
・96-well tube plates または 8-well strip tubes ・cap strips	ご使用のサーマルサイクラーに適したプラスチックウェアをご用意ください
核酸分析システム (装置+消耗品)	表 7 を参照
(オプション) Qubit 4 Fluorometer and Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific p/n Q33238 and p/n Q32856
Heat blocks or water baths heated to 37°C and 50°C	General laboratory supplier
DNA LoBind Tubes, 1.5-mL PCR clean, 250 pieces	Eppendorf p/n 022431021 または相当品
Microcentrifuge	Eppendorf microcentrifuge, model 5417C または相当品
Centrifuge for 8-well strip tubes, 3000–5000 rpm	相当品
Centrifuge for 96-well plate (if using 96-reaction kits)	相当品
DynaMag-96 Side Magnet or Magnum EX Universal 96-well Magnet Plate	Thermo Fisher Scientific p/n 12331D or Alpaqua p/n A000380 または相当品 (Dyna-Mag-96 (12331D) は 96 well plate・8 連チューブ兼用。マグナススタンド [日本ジェネティクス](p/n FG-SSMAG2)も使用可 (8 連チューブ用)。)
Multichannel and single channel pipettes	Rainin Pipet-Lite Multi Pipette または相当品
(オプション) Reagent reservoirs for use with multichannel pipettes	相当品
Sterile, nuclease-free aerosol barrier pipette tips, vortex mixer, cold rack, ice bucket, and powder-free gloves	相当品

表 7 核酸分析プラットフォーム(いずれかを選択)

品名	メーカーと型番
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent p/n G2991AA / G2992AA
消耗品	
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	p/n 5067-5582
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	p/n 5067-5583
96-well sample plate	p/n 5042-8502
96-well plate foil seals	p/n 5067-5154
8-well tube strips	p/n 401428
8-well tube strip caps	p/n 401425
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer	Agilent p/n M5310AA / M5311AA / M5312AA
消耗品 (いずれかのキットを選択*)	
NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	p/n DNF-473-0500
Small Fragment Kit (1-1500bp)	p/n DNF-476-0500
HS NGS Fragment Kit (1-6000bp)	p/n DNF-474-0500
HS Small Fragment Kit (1-1500bp)	p/n DNF-477-0500

*Fragment Analyzer システム用の DNA キットを選択する際にはサンプルタイプや品質、インプット量、インサートサイズを考慮してください。

ゲノムDNA断片化に必要な器具・消耗品

gDNA の断片化に必要な器具・消耗品を表 8 に記載しています。高品質 gDNA や FFPE 由来の gDNA では断片化が必要です。cfDNA の場合には断片化は必要ありません。

表 8 gDNA サンプルの断片化に必要な器具・消耗品

品名	メーカーと型番	補足
Covaris Sample Preparation System	Covaris model E220	断片化条件の最適化を行うことでその他の Covaris の装置モデルやサンプルホルダーも使用可能です。
Covaris microTUBE sample holders	Covaris p/n 520045	

2. ゲノムDNAの断片化

Step 1. 断片化の準備	15
Step 2. ゲノム DNA の断片化	16

この章では、機械的断片化による gDNA サンプルの断片化について説明しています。gDNA は Avida DNA ワークフローで使用する前に断片化を行う必要があります。

N O T E

断片化は gDNA サンプルを使用する場合のみ行います。cfDNA サンプルを使用する場合にはこの工程をスキップし、["3. PCR-free ライブラリ調製"](#)に進んでください。

Step 1. 断片化の準備

NOTE

本プロトコルは、Covaris model E220 装置と 130 μ L Covaris microTUBE により条件が最適化されています。他の Covaris 装置やサンプルホルダーを用いる場合、ターゲットサイズの DNA 断片が得られる条件について、装置取り扱い会社にお問い合わせください。

1. コバリス E220 を起動します。操作の詳細は、コバリス社のユーザーガイドを参照ください。
 - a. 製造元の推奨に従い、最適な高さまで脱イオン水をコバリスのタンクに注ぎます。
 - b. チューブのガラス部分が水で覆われているか確認してください。
 - c. コントロールパネル上で、Degas (脱ガス) ボタンを押します。製造元の推奨に従い装置の脱気を行います。(通常 30～60 分ほどです。)
 - d. コバリスのウォーターバス内の水温表示が 5°C になるように、外部循環冷却装置の水温を 2～5°C の間に設定します。凍結防止用のクーラント液の添加については、メーカーの推奨事項を参照してください。
2. 断片化を行う 10～100 ng の gDNA サンプルを 1X Low TE Buffer で 50 μ L に調製します。

Step 2. ゲノムDNAの断片化

1. 先がテーパー状になったピペットチップを用い、コバリスの microTUBE のキャップ上面にあるスリットにチップの先を差し込んで、50 μ L DNA サンプルを Covaris microTUBE に移します。
2. microTUBE を 30 秒遠心し、液を底に集め、底部にある泡を取り除きます。microTUBE 内に泡が残らないように注意してください（泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します）。
3. サンプルを入れた microTUBE を、コバリスのチューブホルダーにセットします。表 9 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 9 コバリス E シリーズ装置による断片化設定条件 (SonoLab software v7 以降)

Setting	高品質 gDNA	FFPE 由来 gDNA
Duty Factor	10%	10%
Peak Incident Power (PIP)	175	175
Cycles per Burst	200	200
Treatment Time	2 x 60 seconds	240 seconds
Bath Temperature	2° to 8°C	2° to 8°C

高品質 DNA のみ、下記の手順にて 2 段階で断片化を実施してください。

- a. 60 秒断片化します。
 - b. microTUBE を 10 秒間遠心します。
 - c. microTUBE を高速で 5 秒間ボルテックスします。
 - d. microTUBE を 10 秒間遠心します。
 - e. ステップ a から d を繰り返します。
4. 断片化が終了したら、microTUBE をホルダーから取り出し、アンローディングステーションの上に載せます。
 5. microTUBE を軽く遠心し、microTUBE の蓋をしたままの状態、スリットからピペットチップの先を差し込み、サンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
 6. 断片化されたサンプル全量（約 50 μ L）を、新しい 8 strip tube に移します（この後のステップで、選択したチューブサイズに適合したビーズ分離用のマグネットスタンドが必要となります）。サンプルを氷上に置きます
 7. DNA サンプルを移した後、microTUBE を遠心し残存したサンプルを集めます。チューブ内に残ったサンプルをできるだけ回収し、step 6 のチューブに移します。

50 μ L の断片化 gDNA サンプルはそのままライブラリ調製のステップに用いることができます。”[3. PCR-free ライブラリ調製](#)”に進んでください。

このステップは stopping point ではありません。

3. PCR-freeライブラリ調製

Step 1. End prep (末端修復と dA 付加)	18
Step 2. ライゲーション	19
Step 3. ライブラリのビーズへの結合	20

この章では、PCR-free ライブラリ調製ステップについて説明しています。NGS ライブラリは Unique Molecular Identifiers (UMIs) を含むアダプターを用いて作製されます。

必要な DNA サンプルインプット量に関しては表 4 を参照してください。

この章では表 10 の試薬を使用します。

表 10 PCR-free ライブラリ調製に使用する試薬

試薬名	使用方法	試薬ボックス・保管温度
End Prep Buffer (tube with purple cap)	室温で融解、使用前にボルテックス	Avida DNA Reagent Box 1, stored at -20°C
End Prep Enzyme (tube with blue cap)	使用直前に氷上	
Ligation Buffer (tube with green cap or bottle)	室温で融解、使用前にボルテックス	
Ligation Enzyme (tube with yellow cap)	使用直前に氷上	
Adaptor for ILM (tube with orange cap)	室温で融解、融解後は氷上	
Hyb Blocker (tube with red cap)	室温で融解	Avida Beads Box, stored at 4°C
Library Binding Beads (tube with white cap or bottle)	15 分以上室温に戻してから使用	
Nuclease-free Water (tube with clear cap or bottle)	-	
Library Wash Buffer (bottle)	-	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, stored at Room Temperature
Avida DNA Panel*	室温で融解、融解後は氷上	Stored at -20°C

*使用可能な Avida DNA パネルは 10 ページの表 3 に記載しています。

CAUTION

実験を始める前に“[操作と安全に関する注意事項](#)”を必ず確認してください。

Avida DNA ワークフローではキャプチャー前の増幅を行いません。サンプルを移す際にはチューブやチップ内にサンプルが残っていないことを確認し、サンプルのロスがないようにピペッティングを行ってください。

3. PCR-free ライブラリ調製

NOTE

ワークフローを開始する前に、“4. ターゲットキャプチャー”で使用する Hyb Wash Buffer 1 のボトルを加熱します。Buffer が十分に加熱され、融解していることを確認してください。Hyb Wash Buffer 1 は Avida DNA and Duo Reagent Box 2 に含まれています。

- ・ ウォーターバスが使用可能な場合、ボトルを 50°C で 10 分間加熱します。その後、ボトルを 50°C のヒートブロックに移します。“4. ターゲットキャプチャー”で使用するまでボトルを 50°C で維持します。
- ・ ウォーターバスがない場合、ボトルを 50°C のヒートブロックに置き、“4. ターゲットキャプチャー”で使用するまでボトルを 50°C で維持します。

ボトルがヒートブロックに入らない場合はボトルを横にしてヒートブロック上に置き、接触面積を増やします。ヒートブロックの代わりに 50°C に設定したサーマルサイ클ーを使用することもできます。

Step 1. End prep (末端修復とdA付加)

1. End Prep Buffer を室温で溶かし、ボルテックスで混合します。バッファーが完全に溶けて細かい粒子が残存していないか目視で確認してください。もし粒子が確認できる場合、ボルテックスを続け完全に溶かします。
2. 適切な量の DNA を 50 µL の容量でストリップチューブに加えます。サンプル液量が 50 µL に満たない場合は Nuclease-free Water で 50 µL になるよう希釈します。DNA サンプルインプット量の詳細は表 4 を確認してください。サンプルは氷上に置きます。
 - ・ cfDNA サンプル: 1~100 ng
 - ・ 断片化 gDNA サンプル: 10~100 ng (“2. ゲノム DNA の断片化”で調製)
3. 表 11 を参照し、適切な量の End Prep Mix を室温で調製します。試薬は記載順に混合し、低速で軽くボルテックスした後、軽くスピンドウンします。

調製後の End Prep Mix は氷上に置きます。調製後の End Prep Mix は 4°C で 2 時間まで安定です。

表 11 End Prep Mix の調製

試薬	1 反応	8 反応分 (余剰量含む)	16 反応分 (余剰量含む)
End Prep Buffer	7 µL	63 µL	126 µL
End Prep Enzyme	3 µL	27 µL	54 µL
Total	10 µL	90 µL	180 µL

4. 10 µL の End Prep Mix を DNA サンプルが入った各チューブに加えます。この時点でサンプル液量は 60 µL になります。軽くボルテックスするか、50 µL にセットしたピペッターでピペティングをゆっくり 15~20 回繰り返します。軽くスピンドウンし、氷上に置きます。気泡がごく微量の場合にはパフォーマンスに影響を与えません。

5. サーマルサイクラーのプログラムを表 12 の内容に設定します。蓋の温度は 75°C に設定します。蓋が加温されたらプログラムを一時停止し、チューブをセットして反応を再開します。

表 12 End prep サーマルサイクルプログラム

ステップ	温度	時間
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	65°C	30 minutes
Step 3	4°C	Hold

6. 次のステップで使用する Ligation Buffer と Adaptor for ILM を室温でそれぞれ溶かし始めます。融解後にしっかりとボルテックスをします。Adaptor for ILM は融解後氷上に保管します。Ligation Buffer は完全に溶けて細かい粒子が残存していないか目視で確認してください。もし粒子が確認できる場合、完全に溶けるまでボルテックスを続けます。

Step 2. ライゲーション

1. End Prep サーマルサイクルプログラムの実行中に、表 13 を参照し、適切な量の Ligation Master Mix を 1.5 mL チューブに室温で調製します。Ligation Master Mix をボルテックスし、軽くスピンドウンします。調製後の溶液は使用するまで氷上に置きます。

CAUTION

このステップで使用する Ligation Buffer と Ligation Enzyme Mix は粘性が非常に高いです。これらの試薬を含む溶液をピペティングする際は十分に気を付けてください。

調製後の Ligation Master Mix は 4°C で 2 時間まで安定です。

表 13 Ligation Master Mix の調製

試薬	1 反応	8 反応分 (余剰量含む)	16 反応分 (余剰量含む)
Ligation Buffer	25 µL	225 µL	450 µL
Ligation Enzyme	6 µL	54 µL	108 µL
Total	31 µL	279 µL	558 µL

2. End prep サーマルサイクルプログラムの完了後、DNA サンプルの入ったチューブを取り出し、室温に置きます。サーマルサイクルプログラムを終了し、蓋が加温されていないことを確認します。
3. 5 µL の Adaptor for ILM を各 DNA サンプルに加えます。

CAUTION

Adaptor for ILM を Ligation Master Mix に混合しないでください。Adaptor を室温環境にできる限り置かないようにしてください。

4. 31 µL の Ligation Master Mix を各 DNA サンプルに加えます。この時点でサンプル液量は 96 µL になります。軽くボルテックスするか、70 µL にセットしたピペッターでピペティングを 15~20 回繰り返し混合した後、サンプルを軽くスピンドウンします。

3. PCR-free ライブラリ調製

5. サーマルサイクラーが室温に戻っていることを確認し、プログラムを表 14 の内容に設定し開始します。蓋は加温しない設定にします。すぐにプログラムを一時停止し、チューブをセットして反応を再開します。

表 14 Ligation サーマルサイクルプログラム

ステップ	温度	時間
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

6. Ligation サーマルサイクルプログラムの間に次のステップで使用する以下の試薬を準備します。

- Library Binding Beads を“[Step 3. ライブラリのビーズへの結合](#)”で使用する 15 分以上前に室温に戻します。
- Hyb Buffer を 37°C のヒートブロックまたはウォーターバスで短くとも 10～20 分、あるいは Hyb Buffer が完全に溶けるまで加熱します。Hyb Buffer がボトルで提供されており、ボトルがヒートブロックに入らない場合はボトルを横にしてヒートブロック上に置き、接触面積を増やします。Hyb Buffer が完全に溶けた後は使用するまで室温に置きます。Hyb Buffer は“[4. ターゲットキャプチャー](#)”で使います。

NOTE

ウォーターバスやヒートブロックがない場合は、37°C に設定したサーマルサイクラーのサーマルブロック上に置いて加温します。この方法の場合は、特にバッファーがボトルで提供されている場合に、通常より時間がかかります。

- Hyb Blocker、Hyb Enhancer、Avida パネルを室温で溶かします。溶けた後 Avida パネルは氷上に、Hyb Blocker と Hyb Enhancer は室温にそれぞれ置きます。Hyb Blocker と Avida パネルは表 15 の Hyb Mix 1 の調製に使います。Hyb Enhancer は“[4. ターゲットキャプチャー](#)”で使います。

CAUTION

Hyb Enhancer は室温で溶かす必要があります。溶かした後に沈殿が見える場合は、溶液が透明になるまでボルテックスを行います。

Step 3. ライブラリのビーズへの結合

1. Ligation サーマルサイクルプログラムの完了後、サーマルサイクラーからチューブを取り出します。
2. Library Binding Beads が入ったボトルをしっかりとボルテックスし、ビーズを完全に混合します。チューブまたはボトルを立てて 5 分間静置し、飛び散った液がボトルの底に落ちるのを待ちます。
3. 87 μ L (0.9X volume) の Library Binding Beads を各サンプルに加えます。この時点でサンプル液量は 183 μ L になります。150 μ L にセットしたピペッターでピペティングを 15～20 回繰り返します。ビーズが沈殿しない程度に 1～2 秒遠心し、チューブの底に液を集めます。

ピペティングは気泡が発生しないよう、ゆっくりと行います。気泡によりライブラリの結合効率が低下します。
4. 室温で 10 分間インキュベーションし、Library bead binding 反応を行います。

5. **10 分間のインキュベーションの間に**、表 15 に従い、Hyb Mix 1 を 1.5 mL チューブに調製します。Hyb Mix 1 をしっかりとボルテックスし、軽くスピンドウンします。次の章で使用するまで室温に置きます。

N O T E

複数サンプルを取り扱う際は、Hyb Mix 1 を 26 μ L (1 サンプル分) ずつ新しいストリップチューブに分注します。23 ページのステップ 1 では、マルチチャネルピペッターで 24 μ L の Hyb Mix 1 をアダプター付加ライブラリが結合したビーズへ移すようにします。これによりビーズが完全に乾燥するのを防ぎます。

表 15 Hyb Mix 1 の調製

試薬	1 反応	8 反応分 (余剰量含む)	16 反応分 (余剰量含む)
Nuclease-free Water	17.5 μ L	157.5 μ L	315 μ L
Avida DNA Panel	4.0 μ L	36.0 μ L	72.0 μ L
Hyb Blocker	2.5 μ L	22.5 μ L	45.0 μ L
Total	24.0 μL	216.0 μL	432.0 μL

6. 10 分間のインキュベーションが完了後、ストリップチューブをマグネットスタンドにセットし、2 分間あるいは溶液が透明になるまで静置します。

N O T E

溶液が透明になるまで 2 分以上かかる場合があります。次のステップに進む前にビーズが十分に集まっていることと、溶液が透明であることを目視で確認してください。

7. ビーズに触れないように上清を完全に取り除きます。**ストリップチューブはマグネットスタンドに置いたままにします。**
8. 180 μ L の Library Wash Buffer をビーズのペレットを崩さないように各チューブに加え、室温で 2 分間インキュベーションします。
9. 各チューブから上清を取り除きます。
10. (オプション)ステップ 8 とステップ 9 を繰り返します。
- この 2 回目の洗浄はシーケンス結果における on-target%の改善に有効な場合がありますが、分子回収率はわずかに低下させる可能性があります。
11. 残った上清をチューブの底に集め、20 μ L のピペッターを用いて完全に取り除きます。
- 上清を完全に取り除く際の操作に関しては 9 ページの“[操作に関する注意](#)”を併せて参照してください。
12. ストリップチューブをマグネットスタンドから取り外します。
- アダプター付加ライブラリは Library Binding Beads に結合した状態です。
13. **すぐに** 23 ページのステップ 1 に進み (“4. [ターゲットキャプチャー](#)”)、あらかじめ準備した Hyb Mix 1 をビーズが乾かないうちに加えてください。

4. ターゲットキャプチャー

Step 1. ハイブリダイゼーション	23
Step 2. キャプチャービーズの調製	25
Step 3. ビーズキャプチャー	27
Step 4. キャプチャービーズの洗浄	28

この章では、ターゲットキャプチャーについて説明しています。アダプター付加ライブラリはターゲット特異的なパネルでハイブリダイズされます。ハイブリダイゼーション後にターゲットの分子はストレプトアビジンビーズによってキャプチャーされます。

この章では表 16 の試薬を使用します。

表 16 ターゲットキャプチャーに使用する試薬

試薬名	使用方法	試薬ボックス・保管温度
Hyb Buffer (tube with clear cap or bottle)	37°C のウォーターバスまたはヒートブロックで使用前に 10～20 分加温。Buffer が透明になった後は室温で保管	Avida DNA Reagent Box 1, stored at -20°C
Hyb Enhancer (amber tube with green cap)	室温で融解	
Capture Beads (tube with amber cap)	しっかりとボルテックスした後に使用	Avida Beads Box, stored at 4°C
Nuclease-free Water (tube with clear cap or bottle)	-	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, stored at Room Temperature
Hyb Wash Buffer 1 (bottle)	使用するまでボトルを 50°C のウォーターバスまたはヒートブロックで加温	Stored at -20°C
Hyb Wash Buffer 2 (bottle)	-	
Resuspension Buffer (tube with red cap or bottle)	-	
Hyb Mix 1	前工程で調製(21 ページ)、使用するまで室温	

Step 1. ハイブリダイゼーション

- 21 ページで調製した 24 μL の Hyb Mix 1 を、前工程で得たアダプター付加ライブラリが結合したビーズに加えます。ビーズを軽くボルテックスあるいは 15～20 回のピペティングで懸濁し、軽くスピンドウンします。

NOTE

ページの Hyb Mix 1 の調製の際に、Hyb Mix 1 を 26 μL (1 サンプル分) ずつ新しいストリップチューブに分注していた場合、アダプター付加ライブラリが結合したビーズに 24 μL の Hyb Mix 1 を加える操作にマルチチャンネルピペッターを使用できます。

- 20 ページのステップ 6 で加温し溶かした Hyb Buffer をしっかりとボルテックスします。
- Avida DNA パネルサイズに応じて Hyb Mix 2 を調製します。

表 17 – パネルサイズが 500 kb 未満の場合 (Focused Cancer Panel、Expanded Cancer Panel)

表 18 – パネルサイズが 500 kb 以上の場合 (Discovery Cancer Panel)

適切な液量の試薬を混合した後、Hyb Mix 2 をしっかりとボルテックスして混合し、スピンドウンします。Hyb Mix 2 は室温に置きます。

Hyb Buffer は後の工程で使用するまで室温に置きます。

表 17 パネルサイズが 500 kb 未満の場合の Hyb Mix 2 の調製

試薬	1 反応	8 反応分 (余剰量含む)	16 反応分 (余剰量含む)
Hyb Buffer	30 μL	270 μL	540 μL
Hyb Enhancer	6 μL	54 μL	108 μL
Total	36 μL	324 μL	648 μL

表 18 パネルサイズが 500 kb 以上の場合の Hyb Mix 2 の調製

試薬	1 反応	8 反応分 (余剰量含む)	16 反応分 (余剰量含む)
Hyb Buffer	31 μL	279 μL	558 μL
Hyb Enhancer	5 μL	45 μL	90 μL
Total	36 μL	324 μL	648 μL

- 36 μL の Hyb Mix 2 を Hyb Mix 1 を含むビーズ懸濁液 (ステップ 1 で調製) に加えます。この時点でサンプル液量は 60 μL になります。
- 50 μL に設定したピペッターでピペティングを 15～20 回繰り返します。ビーズが沈殿しない程度に 1～2 秒遠心し、チューブの底に液を集めます。

4. ターゲットキャプチャー

6. サーマルサイクルプログラムを表 19 の内容に設定します。蓋の温度は 103°C に設定します。蓋が加温されたらプログラムを一時停止し、チューブをセットして反応を再開します。

表 19 Hybridization サーマルサイクルプログラム

ステップ	温度	時間
Step 1	98°C	2 minutes
Step 2	≥2.5°C/second ramp down to 60°C	
Step 3	60°C	60 minutes
Step 4	60°C	Hold

N O T E

表 19 のサーマルサイクルプログラムでは 60 分のハイブリダイゼーションを行います。ほとんどのアプリケーションで十分なハイブリダイゼーション時間ですが、Avida DNA Discovery Panel を含む、500 kb より大きいパネルの場合はハイブリダイゼーション時間を長くする（最長 16 時間）ことでキャプチャー効率を改善できる可能性があります。

Step 2. キャプチャービーズの調製

CAUTION

Hyb Wash Buffer 1 は保管中に白濁または析出することがあります。溶液を 50°C に加温して完全に溶けていることを確認してください。使用前にボトルをしっかりとボルテックスあるいは転倒混和により攪拌してください。

キャプチャービーズの調製はハイブリダイゼーション反応が完了する 15 分前に実施するようにしてください。

1. “Step 1. ハイブリダイゼーション”のステップで使用した後に室温に置いておいた Hyb Buffer をしっかりとボルテックスします。
2. Capture Beads が均一になるまでしっかりとボルテックスします。
3. 1 反応当たり 8 μL の Capture Beads が必要です。必要なビーズ液量を 10% の余剰量分含めて計算し、1.5 mL チューブに移します。

NOTE

Capture Beads を 1.5 mL チューブで調製する場合には、専用のマグネットスタンドが必要です。必要に応じて必要量のキャプチャービーズを PCR チューブに分注して調製することが可能です。

4. Capture Beads の入ったチューブをマグネットスタンドにセットし、1 分間あるいは溶液が透明になるまで静置します。上清を捨て、マグネットスタンドからチューブを取り外します。
5. 表 20 の液量に従い、あらかじめ加温した Hyb Wash Buffer 1 を Capture Beads に加えます。ボルテックスまたはピペッティングを 15~20 回繰り返し、ビーズをしっかりと懸濁し、よく混合します。ビーズがしっかりと懸濁し、混合されていることを確認して下さい。100 μL 以上で洗浄する場合はピペッティングがより効果的です。

表 20 洗浄に使用する Hyb Wash Buffer 1 の使用量

反応数	液量
1~16	100 μL
17~32	200 μL
33~48	300 μL
49~64	400 μL
65~80	500 μL
81~96	600 μL

6. Capture Beads の入ったチューブを軽くスピンドウンした後マグネットスタンドにセットし、1 分間あるいは溶液が透明になるまで静置します。その後上清を取り除きます。
7. ステップ 5 とステップ 6 を繰り返して合計 2 回洗浄します。

Hyb Wash Buffer 1 を 50°C のヒートブロックまたはウォーターバスに戻します。

4. ターゲットキャプチャー

8. Capture Beads の入ったチューブをマグネットスタンドから取り外し、あらかじめ計算したビーズ液量と等量の Hyb Buffer で懸濁します。気泡が入らないようピペティングを 15～20 回繰り返し混合します。

N O T E

Capture Beads の再懸濁には Hyb Buffer を使用します。

9. 再懸濁した Capture Beads を新しいストリップチューブに 8 μ L ずつ分注します。

Step 3. ビーズキャプチャー

1. ハイブリダイゼーションサーマルサイクルの完了後、サンプルを取り出します。Hybridization サーマルサイクルプログラムを停止し、表 21 の Wash サーマルサイクルプログラムを開始します。蓋の温度は 75°C に設定します。

表 21 Wash サーマルサイクルプログラム

ステップ	温度	時間
Step 1	60°C	Hold

2. チューブを軽くスピンドウンし、マグネットスタンドにセットし、30 秒間あるいは溶液が透明になるまで（最長 1 分）静置します。
3. 26 ページのステップ 9 で分注した 8 μ L の Capture Beads に**上記ステップ 2 の上清（約 60 μ L）を注意深く移します**。上清を全て移すよう注意してください。ピペッティングを 15～20 回または十分に混合するまで繰り返します（このステップではボルテックスをしないようにします）。ビーズが沈まない程度に 1～2 秒スピンドウンします。
4. ストリップチューブをサーマルサイクラーにセットして、60°C で 10 分間ハイブリダイズしたサンプルのビーズへの結合を行います。
5. 10 分後にチューブをサーマルサイクラーから取り出し、マグネットスタンドにセットし、30 秒間あるいは溶液が透明になるまで（最長 1 分）静置します。上清を完全に取り除きます。サーマルサイクラーは 60°C の状態を維持します。
6. ストリップチューブをマグネットスタンドから取り外し、すぐに**Step 4. キャプチャービーズの洗浄**に進みます。

Step 4. キャプチャービーズの洗浄

複数のサンプルを処理する場合には、Hyb Wash Buffer 1 と Hyb Wash Buffer 2、Resuspension Buffer をリザーバーに移し、マルチチャンネルピペットを使用することを推奨します。

マグネットスタンドに応じた上清を完全に取り除く際の操作に関しては 9 ページの“[操作に関する注意](#)”を参照ください。

CAUTION

このセクションのステップ 1 からステップ 5 では、サンプルのボルテックスやスピンはしないでください。飛び散らないようチューブを丁寧に取り扱ってください。

1. 150 μ L の加温した Hyb Wash Buffer 1 を Capture Beads/ライブラリ DNA ハイブリッドが入ったチューブに加えます。ピペッティングを 15~20 回繰り返して、ビーズを完全に懸濁します。
2. ストリップチューブをマグネットスタンドにセットし、30 秒間あるいは溶液が透明になるまで静置し、上清を取り除きます。さらに 20 μ L にセットしたピペットで残った上清を完全に取り除きます。
3. マグネットスタンドからチューブを取り外し、100 μ L の Hyb Wash Buffer 1 を加えます。ピペッティングを 15~20 回繰り返してビーズを完全に懸濁し、**全量 (ビーズ、バッファー、気泡を含む) を新しいストリップチューブに移します。**
4. ストリップチューブをサーマルサイ클ーにセットし、60°C で 3 分間インキュベーションします。
5. 3 分後にストリップチューブを取り外し、サーマルサイクルプログラムを停止します。
6. ストリップチューブをマグネットスタンドにセットし、30 秒間あるいは溶液が透明になるまで静置し、上清を取り除きます。さらに 20 μ L にセットしたピペットで残った上清を完全に取り除きます。
7. マグネットスタンドからチューブを取り外します。
8. 150 μ L の室温の Hyb Wash Buffer 2 を加えます。ピペッティングを 15~20 回繰り返して、ビーズを完全に懸濁し、軽くスピンドウンします。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルは Hyb Wash Buffer 2 に懸濁した状態で 4°C で一晩保存できます。

9. チューブをマグネットスタンドにセットし、1 分間あるいは溶液が透明になるまで静置し、上清を取り除きます。さらに 20 μ L にセットしたピペットで残った上清を完全に取り除きます。
10. マグネットスタンドからチューブを取り外します。
11. 20 μ L の Resuspension Buffer を加えます。低速でやさしくボルテックスするか、チューブをはじいてビーズを懸濁します。軽くスピンドウンし、“[5. インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認](#)”に進みます。

CAUTION

ビーズを廃棄しないようにしてください。DNA が結合したビーズ全量をインデックス PCR に使用します。

5. インデックスPCR、ライブラリ精製、品質確認

Step 1. インデックス PCR.....	30
Step 2. ライブラリの精製	32
Step 3. ライブラリ DNA の品質確認と定量	33

この章では、インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認のセクションについて説明しています。キャプチャーしたライブラリは増幅され、インデックスが付加されます。インデックス付加後のライブラリを分析し、収量と品質の確認を行います。

この章では表 22 の試薬を使用します。

表 22 インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認に使用する試薬

試薬名	使用方法	試薬ボックス・保管温度
2X Amplification Mastermix (tube with white cap or bottle)	氷上で融解	Avida DNA Reagent Box 1, stored at -20°C
Avida Index Primer Pairs	ストリップチューブまたは plate で提供。 氷上で融解	Stored at -20°C
Nuclease-free Water (tube with clear cap or bottle)	-	Avida DNA and Duo Reagent Box 2, stored at Room Temperature
AMPure XP Beads	30 分以上室温に戻してから使用	キットに含まれません
100% ethanol	-	キットに含まれません
1X Low TE Buffer	-	キットに含まれません
Qubit dsDNA HS or BR Assay Kit (optional)	-	キットに含まれません
Nucleic acid analysis kit	-	キットに含まれません

Step 1. インデックスPCR

CAUTION

インデックス PCR 反応のセットアップ中にアンプリコンのコンタミネーションを避けるよう注意してください。8 ページの“[コンタミネーション防止のための重要な操作](#)”を参照してください。

1. 使用前に 2X Amplification Mastermix と Avida Index Primer Pair を氷上で溶かします。溶かした後、2X Amplification Mastermix を低速でボルテックスします。Avida Index Primer Pair が入ったストリップチューブまたはプレートを軽くスピンドウンします。
2. DNA が結合した Capture Beads 懸濁液 (28 ページのステップ 11 で調製) に、25 μL の 2X Amplification Mastermix を加えます。ピペティングを 15~20 回繰り返し混合し、軽くスピンドウンします。
3. 適切な 5 μL の Avida Index Primer Pair を加えます (ピペットチップを用いてシールを突き破り、吸い取ります)。ピペティングを 15~20 回繰り返し混合し、軽くスピンドウンします。

同じレーンで各サンプルをシーケンスする場合は異なる index primer pair を用いるようにします。

各チューブはインデックス PCR のための全ての試薬が含まれた状態になります。表 23 に反応液の組成を示します。

表 23 インデックス PCR 反応液の組成

試薬	1 反応あたりの液量
キャプチャーDNA 結合ビーズ懸濁液 (28 ページのステップ 11 で調製)	20 μL
2X Amplification Mastermix	25 μL
Avida Index Primer Pair	5 μL
Total	50 μL

NOTE

インデックスプライマーペアは 8 サンプルごとのグループで使用するようデザインされています。1~8、9~16、17~24 の各セットのインデックスプライマーペアはそのセット内で互換性があります。同じレーンでシーケンスするサンプルには、互換性のあるセット (例えば 1~8) 内のプライマーペアの使用を推奨します。

異なる互換性セットのプライマーペアを使用する場合は、選択したペアがイルミナシーケンスの互換性の要件を満たすことを確認する必要があります。特に 16 塩基 (forward の 8 塩基と reverse の 8 塩基) のいずれにもセット内の全インデックスにわたって A と C または T と G のヌクレオチドだけの塩基がないことを確認してください。

4. 表 24 のインデックス PCR サーマルサイクルプログラムをセットし、開始します。蓋の温度は 103°C に設定します。蓋が加温されたらプログラムを一時停止し、チューブをセットして反応を再開します。

表 24 インデックス PCR サーマルサイクルプログラム

ステップ	サイクル数	温度	時間
Initial denaturation	1	98°C	45 seconds
Amplification stage 1	5	98°C	10 seconds
		63°C	30 seconds
		72°C	30 seconds
Amplification stage 2	Variable、推奨条件は表 25 を参照	98°C	10 seconds
		72°C	1 minute
Final extension	1	72°C	1 minute
Final hold	1	4°C	Hold

表 25 インデックス PCR Amplification stage 2 のサイクル数の推奨

パネルサイズ	サイクル数	Notes
>100 kb	16 or fewer	Avida DNA Discovery Cancer panel : 11 サイクル Avida DNA Expanded Cancer panel : 14 サイクル
>50 kb to 100 kb	17	-
10 kb to 50 kb	18	Avida DNA Focused Panel を含む
<10 kb	19	-

NOTE

表 25 のサイクル数の推奨は 10 ng の cfDNA をサンプルインプットとしたときの場合です。その他のサンプルタイプやインプット量に応じ、以下のガイドラインに基づいてサイクル数を最適化する必要があります。

- ・ 同じサンプルインプット量の場合、高品質 gDNA の場合は cfDNA よりも 1~2 サイクル増やす必要があります。
- ・ 低品質 gDNA (FFPE 由来 gDNA 等) の場合は高品質 gDNA よりさらに多くのサイクルを必要とします。追加のサイクル数はサンプルの分解度に依存し、分解が進むほど多くのサイクルを必要とします。
- ・ サンプルインプット量が 50 ng を超える場合、10 ng インプット時より 1~2 サイクル減らす必要があります。

5. Index PCR サーマルサイクルプログラムの完了後、サンプルを取り出し、氷上に置きます。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルを 4°C で一晩、または -20°C で 72 時間保存できます。

Step 2. ライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. 80%エタノールを、1 サンプルあたり 400 μ L (と 10%の余剰分) を調製します。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。AMPure XP ビーズ溶液 50 μ L を、増幅反応液 (液量 50 μ L) に加えます。ピペティングを 15~20 回程度行い液を混合します。

N O T E

AMPure XP ビーズを加える前に、Capture beads をサンプルから取り除く必要はありません。

4. 室温で 5 分間インキュベーションします。
5. ストリップチューブをマグネットスタンドにセットし、2 分間あるいは溶液が透明になるまで静置し、上清を取り除きます。
6. ストリップチューブをマグネットスタンドに残した状態で、200 μ L の 80%エタノールを加えます。30 秒静置し、上清を取り除きます。
7. ステップ 6 の 80%エタノールによる洗浄を繰り返します。合計で 2 回洗浄します。
8. 20 μ L に設定したピペットで残存した 80%エタノールを完全に取り除きます。チューブをマグネットスタンドに残したままビーズを最長 3 分乾燥させます。過剰な乾燥は避けてください。
9. ストリップチューブをマグネットスタンドから取り外し、23 μ L の 1X Low TE Buffer を加えます。ピペティングを 15~20 回程度行い混合し、軽くスピンドウンします。
10. 室温で 2 分間インキュベーションします。
11. ストリップチューブをマグネットスタンドにセットし、2 分間あるいは溶液が透明になるまで静置します。
12. **上清 20 μ L を新しいチューブに移します。**この際にビーズを持ち越さないように注意します。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルを 4°C で一晩、さらに長期保存の場合は-20°C で保存してください。

Step 3. ライブラリDNAの品質確認と定量

1. (オプション) ライブラリを Qubit dsDNA HS Assay Kit または Qubit dsDNA BR Assay Kit などの蛍光測定により定量します。
2. 各サンプルを表 26 のいずれかのプラットフォームを用いて分析します。各アッセイのユーザーガイド記載のインストラクションを参照してください。

表 26 ライブラリ分析オプション

電気泳動装置	使用キット	サンプル必要量
Agilent 4200/4150 TapeStation system	D1000 ScreenTape	1 µL of sample mixed with 3 µL of D1000 sample buffer*
Agilent 5200, 5300 or 5400 Fragment Analyzer system	いずれかのキットを選択 NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Small Fragment Kit (1-1500bp) HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp) HS Small Fragment Kit (1-1500bp)	2 µL of sample

*サンプルインプットが 100 ng に近い場合にはサンプルの希釈が必要な場合があります。濃度が TapeStation の定量範囲に収まっていることを確認してください。

各分析によりライブラリのサイズ分布を示すエレクトロフェログラムと、DNA 濃度が出力されます。DNA フラグメントのサイズ分布については表 27 のガイドラインを参照してください。TapeStation のエレクトロフェログラムの典型例を図 2 (cfDNA サンプル) と 図 3 (gDNA サンプル) に示します。Fragment Analyzer のエレクトロフェログラムの典型例を図 4 (cfDNA サンプル) と 図 5 (gDNA サンプル) に示します。

解析ソフトウェアの Region 機能などを用いて、ピーク全体からライブラリ DNA の濃度を確認します。

表 27 ライブラリ定性ガイドライン

インプット DNA	期待されるフラグメントサイズのピーク位置
cfDNA	320 bp (図 2 と 図 4 を参照)
Fragmented gDNA*	300~450 bp (図 3 と 図 5 を参照)

*高品質 gDNA の場合。FFPE 由来の gDNA の場合は、フラグメントサイズが小さくなります。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルを 4°C で一晩、さらに長期保存の場合は -20°C で保存してください。

5. インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認

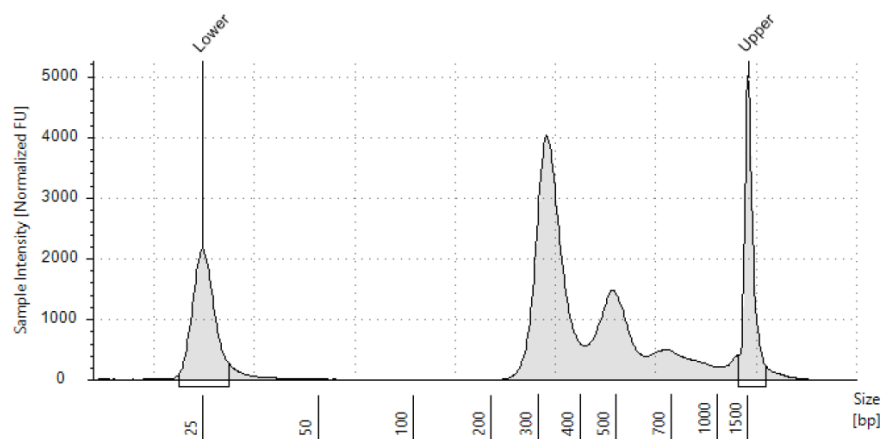


図 2 Avida DNA Focused Cancer Panel でキャプチャーした 10 ng cfDNA から作製したライブラリの TapeStation D1000 ScreenTape アッセイでの泳動例

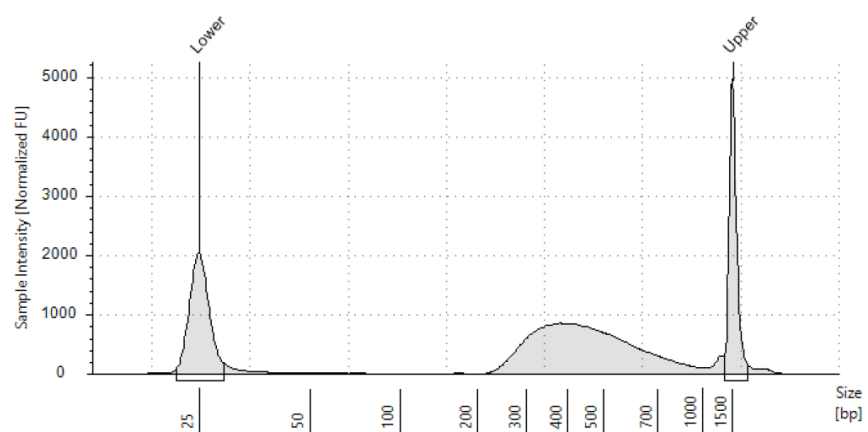


図 3 Avida DNA Focused Cancer Panel でキャプチャーした 10 ng 高品質 gDNA から作製したライブラリの TapeStation D1000 ScreenTape アッセイでの泳動例

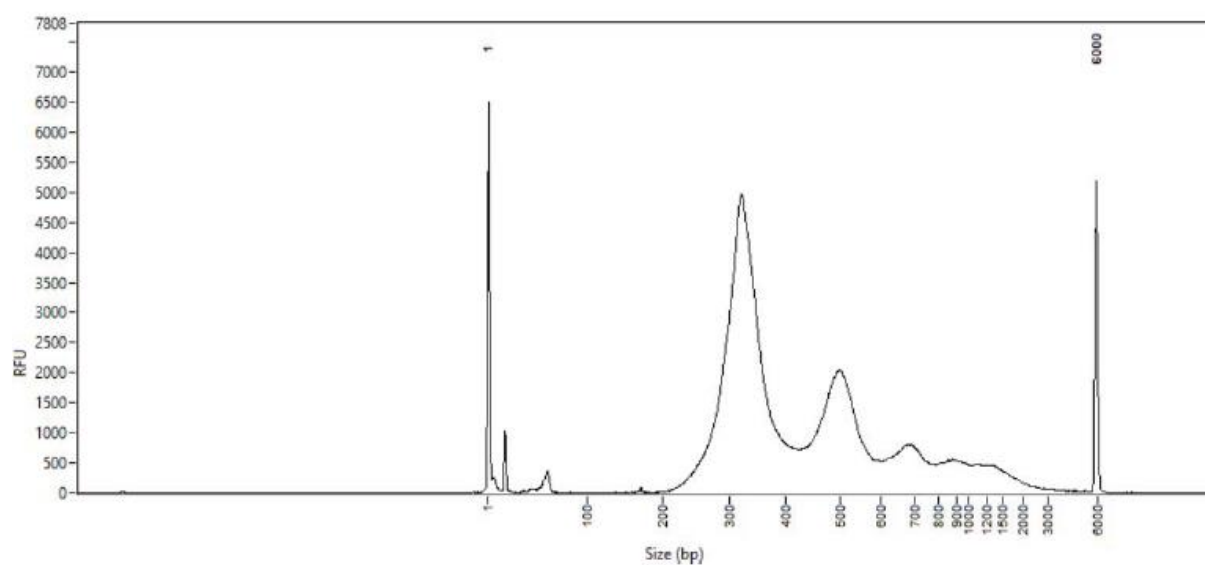


図 4 Avida DNA Focused Cancer Panel でキャプチャーした 10 ng cfDNA から作製したライブラリの Fragment Analyzer NGS Fragment Kit での泳動例

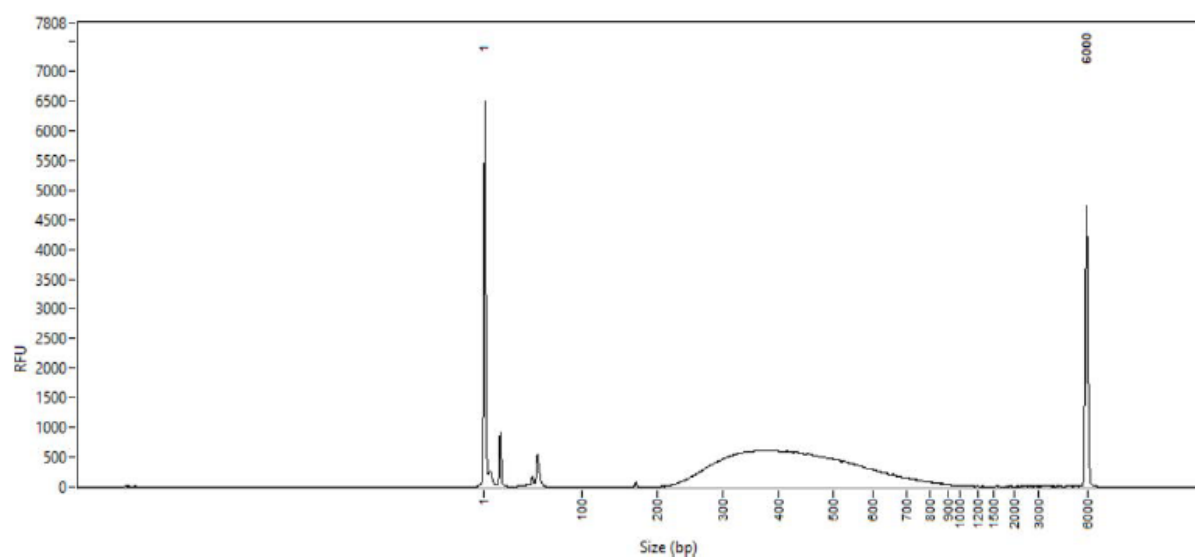


図 5 Avida DNA Focused Cancer Panel でキャプチャーした 10 ng 高品質 gDNA から作製したライブラリの Fragment Analyzer NGS Fragment Kit での泳動例

6. NGSと解析のガイドライン

Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール.....	37
Step 2. シーケンスサンプルの調製.....	38
Step 3. シーケンスの開始.....	39
Step 4. NGS データ解析	40

この章では、ライブラリのシーケンスと解析のガイドラインについて説明しています。シーケンスの実施方法についてはお使いのイルミナプラットフォームのユーザーガイドを参照してください。

Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール

1 つのシーケンスレーンにマルチプレックスできるインデックスライブラリのは数は、研究デザインに必要なシーケンス量と、使用するプラットフォームの仕様により異なります。

以下の手順に従い、各インデックスサンプルがプール中で等モル量になるように、ライブラリを混合します。

方法 1： プールするサンプルそれぞれを、1X Low TE を用いて終濃度が同じになるように希釈します（典型的な濃度は 4～15 nM、もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます）。その後、全てのサンプルを同じ容量混合して、最終的なプールを調製します。

方法 2： プールするサンプルは異なる濃度のまま、それぞれ適切な量を混合して、最終的にプール中で等モル量になるようにします。その後、プールを 1X Low TE を用いて必要とされる容量にします。以下の式はプールに加える各インデックスサンプルの量を計算するための式です。

$$\text{Volume of Index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

(典型的な濃度は 4 nM～15 nM、もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます。)

#: プールするインデックスの数

C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 28 に 4 種のインデックスサンプル（それぞれ異なる初期濃度）の量と、最終的に 20 µL の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE Buffer の例を示します。

表 28 10 nM の濃度でトータル 20 µL に調製する計算例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use (µL)
Sample 1	20 µL	20 nM	10 nM	4	2.5
Sample 2	20 µL	10 nM	10 nM	4	5
Sample 3	20 µL	17 nM	10 nM	4	2.9
Sample 4	20 µL	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

Step 2. シーケンスサンプルの調製

最終的な Avida ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な Paired-end プライマーとケミストリでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 6 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

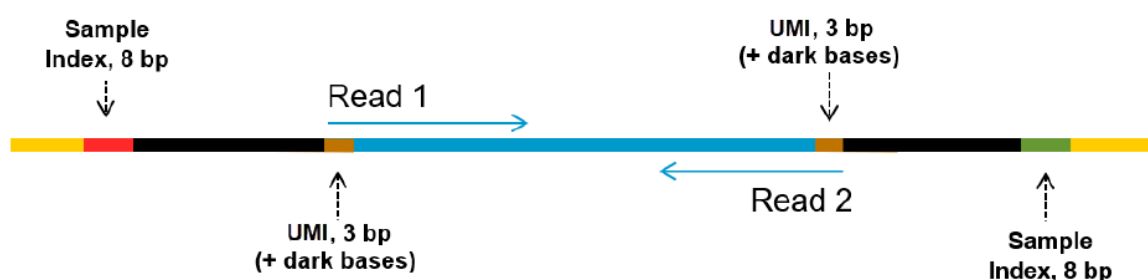


図 6 Avida シーケンスライブラリの構造。各断片は、1 つのターゲットインサート (青)、イルミナ paired-end シーケンスエレメント (黒) とユニークデュアルインデックス (赤および緑)、オプションで Duplex 分子バーコード (茶)、ライブラリブリッジ PCR プライマー (黄) が付加されています。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスター増幅およびシーケンスに進んでください。キットの構成及びシーディング濃度に関してはイルミナ社のガイドラインに従ってください。

シーディング濃度とクラスター密度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、求められるアウトプットやデータの質に基づき、最適化が必要な場合もあります。イルミナ社の推奨するシーディング濃度範囲の中間から最適化を行ってください。より良好なシーケンス QC のための低濃度のスパイクインによる PhiX コントロールにつきましては、イルミナ社の推奨に従ってください。

Step 3. シーケンスの開始

スタンドアロンの装置ソフトウェアあるいは Local Run Manager (LRM) や Illumina Experiment Manager (IEM)、BaseSpace といったイルミナ社のツールを用いて、各サンプルの Read 1 と Read 2 の FASTQ ファイルを生成するようにシーケンスランを設定します。ライブラリの長さに応じた適切なサイクルまたはリード長と 8-bp dual index reads を設定してください。2x150 bp シーケンスランの設定例について表 29 に示します。

表 29 2x 150 bp シーケンスのラン設定

Run Segment	Cycles/Read Length
Read 1	151*
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	151*

*追加の 1 cycle についてはイルミナ社の推奨に従ってください。

各プラットフォームのセットアップやソフトウェアオプションについては以下のガイドラインに加えて、イルミナ社の推奨に従ってください。

- ・サンプルレベルインデックスには 8 bp のインデックスリードが必要です。インデックス塩基配列情報については、11 ページの“Avida インデックス配列情報”を参照し、Avida index sequences spreadsheet をダウンロードしてください。
- ・Avida ライブラリのシーケンスにはカスタムプライマーは使用しません。ランセットアップ中の Read1、Read2、Index 1、Index 2 のカスタムプライマーオプション項目は空欄または未選択にしてください。
- ・イルミナ社のランセットアップソフトウェアおよびリード処理ソフトウェアの adaptor trimming option を使用しないようにしてください。アダプターは後述の方法でトリミングされ、アダプター配列内の UMI が適切に処理されるようになります。
- ・イルミナ社の LRM、IEM または BaseSpace を用いてランセットアップを行う場合には、イルミナ社のカスタムライブラリ調製キットと index kit を用いた場合のインストラクションとサポート情報に従ってセットアップを行ってください。Online で提供している Avida インデックス配列はイルミナ社の指定するサンプルシートにコピーするために .tsv/.csv 形式に変換する必要があります。サポートが必要な場合は弊社テクニカルサポートにお問い合わせください。

Step 4. NGSデータ解析

以下のガイドラインは、典型的な NGS 解析パイプラインステップです。お使いの NGS 解析パイプラインによって異なります。

1. イルミナ社の bcl2fastq、BCL Convert または類似のソフトウェアを用いてデマルチプレックスされた FASTQ ファイルを作成します。このプロセスではデュアルインデックスに基づいてペアエンドリードを生成し、P5 と P7 インデックスが正しく対になっていない配列を取り除きます。イルミナ社のデマルチプレックスソフトウェアで使用できる UMI トリミングオプションは使用しないでください。

NOTE

お使いの解析パイプラインで UMI を除去する場合、次の解析ステップに進む前に Read 1 および Read 2 の最初の 5 塩基をマスキングまたはトリミングすることで除去することができます。

bcl2fastq を使用してデマルチプレックスをする場合、ベースマスク **N5Y*,I8,I8,N5Y*** を含めることで UMI をマスキングすることができます。(*はマスキングした 5 塩基を引いた残りのリード長に置き換えます。例：39 ページ表 29 の 2x150 NGS セットアップの場合は N5Y146,I8,I8,N5Y146) N と Y の値を足すと RunInfo.xml ファイルのリード長になります。

BCL Convert を使用してデマルチプレックスをする場合、Sample Sheet のヘッダーに以下の文字列を含めることで UMI 配列を除去することができます：

OverrideCycles,N5Y*,I8,I8,N5Y* (*はトリミング後のリード長に置き換えます。例：39 ページ表 29 の 2x150 NGS セットアップの場合は **N5Y146,I8,I8,N5Y146**) N と Y の値を足すと RunInfo.xml ファイルのリード長になります。

もしくは適切な処理ツール (例: fgbio) で、デマルチプレックスした FASTQ ファイルから各リードの最初の 5 塩基をトリミングすることも可能です。

2. 適切な処理ツールを用いて、各シーケンスリードからインライン UMI をトリミングし、収集します。例えば、UMI 処理とシーケンスリードのアライメントステップは fgbio の Best Practice Consensus Pipeline を用いて実施できます。

<https://github.com/fulcrumgenomics/fgbio/blob/main/docs/best-practice-consensus-pipeline.md>

出力ファイルには 1) single-stranded UMI consensus reads と 2) double-stranded UMI consensus read を含む、BAM フォーマットの deduplicate リードが含まれます。

- Inline UMI は DNA インサートの両端に付加されます。解析のための UMI 処理の 1 つの方法は、各リード初めの 5 塩基をトリミングし、5 塩基のうち最初の 3 塩基を UMI として、残りの 2 塩基を捨てる方法です。

3. ステップ 2 で作成した BAM ファイルを用いて変異コールとフィルタリングを行います。
4. アライメントの QC メトリクスを収集します。
5. (オプション) QC メトリクスと変異コールを含むレポートを作成します。

7. リファレンス

キットの内容	42
Avida インデックスプライマーペア情報	43
Avida カスタム AddOn パネル	43
トラブルシューティングガイド	46
クイックリファレンスプロトコル	47

この章では、キットに含まれている試薬内容、インデックス配列、トラブルシューティング情報、プロトコルのクイックリファレンスを記載しています。

キットの内容

Avida DNA reagent kits の構成品は表 2 に記載しています。各構成品内に含まれる試薬を表 30 から表 33 に記載しています。

表 30 Avida DNA Reagent Box 1

品名	16 反応キット (p/n 5282-0139)	96 反応キット (p/n 5282-0140)
End Prep Buffer	tube with purple cap	tube with purple cap
End Prep Enzyme	tube with blue cap	tube with blue cap
Ligation Buffer	tube with green cap	bottle
Ligation Enzyme	tube with yellow cap	tube with yellow cap
Adaptor for ILM	tube with orange cap	tube with orange cap
Hyb Blocker	tube with red cap	tube with red cap
Hyb Buffer	tube with clear cap	bottle
Hyb Enhancer	amber tube with green cap	tube with green cap
2X Amplification Mastermix	tube with white cap	bottle

表 31 Avida DNA and Duo Reagent Box 2

品名	16 反応キット (p/n 5282-0141)	96 反応キット (p/n 5282-0142)
Library Wash Buffer	bottle	bottle
Hyb Wash Buffer 1	bottle	bottle
Hyb Wash Buffer 2	bottle	bottle
Resuspension Buffer	tube with red cap	bottle
Nuclease-Free Water	tube with clear cap	bottle

表 32 Avida Bead Box

品名	16 反応キット (p/n 5282-0143)	96 反応キット (p/n 5282-0144)
Library Binding Beads	tube with white cap	bottle
Capture Beads	tube with amber cap	tube with amber cap

Avida インデックスプライマーペア情報

Avida インデックスプライマーペアは混合された状態で提供されます (表 33 を参照)。各プライマーペアはユニークな 8 bp の P5 または P7 インデックスを含み、デュアルインデックスの NGS ライブラリを作成できます。各プライマーのインデックス部分の塩基配列情報は、"[Avida インデックス配列情報](#)"からダウンロードしてください。

表 33 Avida Index Primer Pairs for ILM の内容

Kit 構成品	16 反応	96 反応
Avida Index	Black 8-well strip tube with index pairs 1-8, AND	Clear 96-well plate with index pairs 1–96
Primer Pairs for ILM	Blue 8-well strip tube with index pairs 9-16 または Red 8-well strip tube with index pairs 17-24, AND White 8-well strip tube with index pairs 25-32	または Blue 96-well plate with index pairs 97–192

Index Primer Pair Strip Tubeとプレートマップ

- ・ 黒のストリップには index Primer 1-8 が含まれており、タブに 1 と記載されている側のウェルに #1 が入っています。
- ・ 青のストリップには index Primer 9-16 が含まれており、タブに 9 と記載されている側のウェルに #9 が入っています。
- ・ 赤のストリップには index Primer 17-24 が含まれており、タブに 17 と記載されている側のウェルに #17 が入っています。
- ・ 白のストリップには index Primer 25-32 が含まれており、タブに 25 と記載されている側のウェルに #25 が入っています。

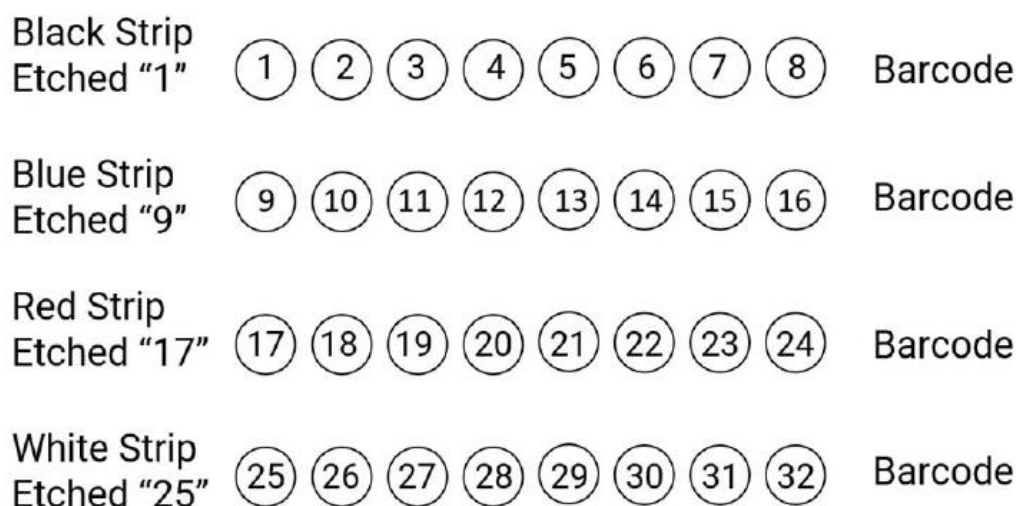


図 7 16 反応キットで提供される Avida Index Primer Pairs ストリップチューブマップ

表 34 Avida Index Primer Pairs 1-96 プレートマップ (透明なプレート)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

表 35 Avida Index Primer Pairs 97-192 プレートマップ (青色のプレート)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

AvidaカスタムAddOnパネル

Avida DNA カスタム AddOn パネルをハイブリダイゼーションに使用する際には、以下のプロトコルの変更が必要になります。

CAUTION

カスタム AddOn パネルがお使いの Avida カタログパネルと対応可能か事前に確認してください。不明な点はアジレントサポートにお問い合わせください。カスタム AddOn パネルは 250 kb 以内に制限されています。

21 ページの Hyb Mix1 の調製の、表 15 の試薬液量を、表 36 の試薬液量に置き換えます。

Avida DNA Focused Cancer Panel (design ID : D3483231) を Avida DNA カタログパネルとして使用する場合は、カスタム AddOn パネルのサイズが 20 kb 未満であることを確認してください。20 kb 以上のサイズの Add-on を必要とする場合はカスタム Avida DNA パネルをご検討ください。

表 36 カスタム AddOn パネルを使用する場合の Hyb Mix1 の調製

試薬	1 反応	8 反応分	16 反応分
Nuclease-Free Water	13.5 µL	121.5 µL	243 µL
Avida DNA Pnael (カタログ)	4.0 µL	36.0 µL	72.0 µL
Avida DNA カスタム AddOn パネル	4.0 µL	36.0 µL	72.0 µL
Hyb Blocker	2.5 µL	22.5 µL	45.0 µL
Total	24.0 µL	216.0 µL	432.0 µL

トラブルシューティングガイド

ライブラリ収量が少ない

- ✓ Library Binding Beads (20 ページの“[Step 3. ライブラリのビーズへの結合](#)”で使用) を使用前に室温に戻したか確認してください。
- ✓ 30 ページの“[Step 1. インデックス PCR](#)”の PCR サイクル数は最適化が必要な場合があります。31 ページのガイドラインを参照して下さい。
- ✓ ワークフローを通じてピペティングやサンプルを移す際のサンプルロスをできるだけ少なくなるようにしてください。
- ✓ サンプルをビーズと混合する際には溶液をしっかりと混合してください。

エレクトロフェログラムのピーク位置が想定と異なる

- ✓ インデックス PCR 反応の際に、他のアッセイのアンプリコンが混入した可能性があります。PCR 前後でワークエリアを分けるようにしてください。共通のワークエリアを使用する場合には、10% bleach solution でワークエリアを拭き、水拭きして 10% bleach solution を取り除きます。8 ページの“[コンタミネーション防止のための重要な操作](#)”を参照してください。

オンターゲット率が低い

- ✓ 20 ページの“[Step 3. ライブラリのビーズへの結合](#)”で、オプションである 2 回目のビーズ洗浄 (21 ページのステップ 10) を行い、全ての wash buffer が取り除かれていることを確認してください。下記の方法で、上清をしっかりと取り除くことができます。

チューブ側面にビーズを集めるマグネットスタンドの場合：マグネットスタンドを 5 回ほどタップします。

チューブ底にビーズを集めるマグネットスタンドの場合：チューブをマグネットスタンドから取り外し、軽くスピンドウンします。再度マグネットスタンドにチューブをセットし、上清を取り除きます。
- ✓ ハイブリダイゼーション後の洗浄の工程で Capture Beads が Wash Buffer 1 と Wash Buffer 2 に完全に懸濁していることを確認し、Wash Buffer がしっかりと取り除けていること (28 ページの“[Step 4. キャプチャービーズの洗浄](#)”を参照) を確認してください。

シーケンスの結果で AT-ドロップアウトが高く uniformity of coverage が低い

- ✓ ハイブリダイゼーションおよび洗浄のサーマルサイクルプログラムが正しく 60°C で行われていることを確認してください (24 ページの表 19 を参照)。また、洗浄時のインキュベーションが 60°C で行われていることを確認してください (27 ページの表 21 を参照)。
- ✓ Hyb Mix 2 の調製をパネルサイズに合った組成で行っているか確認してください。23 ページの表 17 は 500 kb 未満の、23 ページの表 17 は 500 kb 以上のライブラリの場合の組成を示しています。

クイックリファレンスプロトコル

実験操作に慣れた方向けに、プロトコルの手順を以下に要約します。試薬の混合手順や装置の設定など、プロトコル詳細の全てに慣れるまでは完全なプロトコルを使用してください。

グラフィックベースのクイックスタートプロトコルはアジレントのウェブページからダウンロードできます。

<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9409-90500.pdf>

ステップ	工程のサマリー
プロトコルを始める前に：	ウォーターバスまたはヒートブロックでボトルを 50°C に加温
Hyb Wash Buffer 1 の加温	ウォーターバス：10 分間加温し、その後ヒートブロックで使用するまで保温 ヒートブロック：使用するまで加温
PCR-free ライブラリ調製	
End Prep Mix の調製	8 反応 ：63 µL End Prep Buffer + 27 µL End Prep Enzyme 16 反応 ：126 µL End Prep Buffer + 54 µL End Prep Enzyme 氷上に保存
DNA フラグメントの End-Repair と dA 付加	50 µL DNA (cfDNA または断片化 gDNA) + 10 µL End Prep Mix 混合しスピンドウン、氷上に保存 サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋を 75°C に加温)：30 分@20°C、30 分@65°C、Hold@4°C
試薬の準備	Ligation Buffer：室温で溶かす Adaptor for ILM：室温で溶かす、溶けた後は氷上
Ligation master mix の調製	8 反応 ：225 µL Ligation Buffer + 54 µL Ligation Enzyme 16 反応 ：450 µL Ligation Buffer + 108 µL Ligation Enzyme
アダプターライゲーション	5 µL のアダプターを各サンプルに加える 31 µL の Ligation Master Mix を加える 混合しスピンドウン サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋の加温オフ)：30 分@20°C、Hold@4°C
試薬の準備	Library Binding Beads ：少なくとも 15 分前に室温に戻す Hyb Blocker、Hyb Enhancer ：室温で溶かす Avida DNA Panel ：室温で溶かし、その後氷上 Hyb Buffer ：37°C で 10～20 分間加温、その後室温
Library Binding Beads への結合	Library Binding Beads をボルテックスし、5 分静置 87 µL の Library Binding Beads を各サンプルに加える 混合し、ビーズが沈まないようスピンドウン 室温で 10 分間インキュベーション
10 分間のインキュベーション中： Hyb Mix1 の調製	8 反応 ：157.5 µL Nuclease-free Water + 36 µL Avida DNA Panel + 22.5 µL Hyb Blocker 16 反応 ：315 µL Nuclease-free Water + 72 µL Avida DNA Panel + 45 µL Hyb Blocker 室温に保管
洗浄	10 分のインキュベーション後、マグネットスタンドにセットし上清を取り除く 180 µL の Library Wash Buffer で洗浄 マグネットスタンドにセットし上清を取り除く (オプション)Library Wash Buffer での洗浄を繰り返す 上清を全て取り除く サンプルをマグネットスタンドから取り外す

ステップ	工程のサマリー
ターゲットキャプチャー	
Hyb Mix 1 の添加	24 μ L の Hyb Mix 1 を加える 混合しスピンドウン
Hyb Mix 2 の調製	パネルサイズ <500 kb 8 反応 : 270 μ L Hyb Buffer + 54 μ L Hyb Enhancer 16 反応 : 540 μ L Hyb Buffer + 108 μ L Hyb Enhancer パネルサイズ $\geq$ 500 kb 8 反応 : 279 μ L Hyb Buffer + 45 μ L Hyb Enhancer 16 反応 : 558 μ L Hyb Buffer + 90 μ L Hyb Enhancer
ハイブリダイゼーション	36 μ L の Hyb Mix 2 を各サンプルに加える 混合し、ビーズが沈まないようスピンドウン サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋を 103°C に加温): 2 分@98°C、 $\geq$ 2.5°C/second ramp down to 60°C、60 min @60°C、Hold@4°C
ハイブリダイゼーションプログラム中 : キャプチャービーズの調製	キャプチャービーズを混合 キャプチャービーズの必要量を算出 (8 μ L/サンプル + 10%の余剰分) し、1.5 mL チューブに移す (36 μ L を超える場合にはマグネットスタンドにセットし上清を捨て、スタンドから取り外す) 100 μ L の加熱した Hyb Wash Buffer 1 でビーズを 2 回洗浄 チューブをマグネットスタンドから取り外す キャプチャービーズを最初のビーズ液量と等量の Hyb Buffer で再懸濁し、混合 8 μ L の懸濁したキャプチャービーズを新しいストリップチューブに分注する
ビーズキャプチャー	ハイブリダイゼーション完了後、チューブをスピンドウンしマグネットスタンドにセット 上清を 8 μ L ずつ分注したキャプチャービーズに加える 混合し、ビーズが沈まないようスピンドウン サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋を 75°C に加温): hold@60°C 10 分後にチューブを取り出し、マグネットスタンドにセット、上清を取り除く マグネットスタンドからチューブを取り外す
洗浄	150 μ L の加熱した Hyb Wash Buffer 1 でビーズを洗浄 マグネットスタンドにセット、上清をとり除く マグネットスタンドからチューブを取り外す 100 μ L の Hyb Wash Buffer 1 を加え混合 サンプルを新しいストリップチューブに移す サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋を 75°C に加温): hold@60°C 3 分後にチューブを取り出し、マグネットスタンドにセット、上清を捨てる マグネットスタンドからチューブを取り外す 150 μ L の Hyb Wash Buffer 2 でビーズを洗浄 マグネットスタンドにセット、上清を完全に取り除く
再懸濁	マグネットスタンドからチューブを取り外す 20 μ L の Resuspension Buffer を加える 混合しスピンドウン

ステップ	工程のサマリー
インデックス PCR、ライブラリ精製、品質確認	
PCR のセットアップ	25 μL の 2X Amplification Mastermix を加える 5 μL の Primer pair を加える 混合しスピンダウン
インデックス PCR	サーマルサイクラーでインキュベーション (蓋を 103°C に加温): 45 sec @98°C 5 サイクル: 10 sec@98°C、30 sec@63°C、30 sec@72°C 追加のサイクル (表 25 を参照): 10 sec@98°C、1 min@72°C 1 min @72°C Hold @4°C
試薬の準備	AMPure XP beads を室温に戻す 80%エタノールを調製する
ライブラリ精製	50 μL の AMPure XP Beads を加え、混合 室温で 5 分インキュベーション マグネットスタンドにセットし、上清を取り除く、サンプルはマグネットスタンドにセットしたままにする 200 μL の 80%エタノールで洗浄、各洗浄時に上清を取り除く エタノールを完全に取り除き、最長 3 分間ビーズを乾燥させる (マグネットスタンド上、蓋を開けた状態) マグネットスタンドからチューブを取り外す 23 μL の 1X Low TE Buffer を加える 混合し、スピンダウン 室温で 2 分インキュベーションし、サンプルをマグネットスタンドにセットする 上清を新しいチューブに移す
品質確認と定量	(オプション) 蛍光測定 (Qubit 等) を用いてライブラリを定量する TapeStation あるいは Fragment Analyzer でライブラリの品質評価を行う ライブラリを用いてシーケンスにすむかライブラリを保存する (4°C で一晩または -20°C で長期)

ゲノミクス関連製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120 - 477 - 111

Mail: email_japan@agilent.com

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く

9 : 00～12 : 00、13 : 00～17 : 00

※プロトコル名とともに、テクニカルな質問と明示してください。

※価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。