

Magnis NGS Prep System を使用した SureSelect^{XT} HS Target Enrichment

プロトコル

研究専用です。診断には使用できません。

バージョン C0、2021 年 6 月



注意

© Agilent Technologies, Inc. 2019、2021

本書の内容は米国著作権法および国際著作権法によって保護されており、Agilent Technologies, Inc. の書面による事前の許可なく、本書の一部または全部を複製することはいかなる形態や方法（電子媒体への保存やデータの抽出または他国語への翻訳など）によっても禁止されています。

マニュアル番号

G9731-90016

エディション

バージョン C0、2021 年 6 月

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051

テクニカルサポート

米国およびカナダ

電話: 800-227-9770 (オプション 3、4、4)
電子メール:
ngs.support@agilent.com

その他すべての地域

Agilent の世界各地のセールス部門およびお近くのサポートセンターのお問合せ先については、www.agilent.com/genomics の **Contact Us** に記載されています。

保証

このマニュアルの内容は「現状有姿」にて提供されるものであり、今後の改訂版で事前の通知なしに変更される場合があります。弊社は、適用法規が最大限許容する範囲において、本取扱説明書およびそれに含まれる一切の内容に関して、明示黙示を問わず、商品性および特定目的適合性の保証を含むところの一切の保証を行うものではありません。弊社はまた、本書または本書に含まれる一切の内容に関する誤りや、本書の提供、使用、実施に関連した偶発的損害または派生的損害についての法的責任を負うものではありません。お客様が弊社と別途書面で契約書を交わされていて、本書の内容を対象とした保証条件が取り決められており、当該条件が上記の記載内容と異なる場合には、当該契約書の定めを優先します。

技術ライセンス

本書で扱っているハードウェアおよびソフトウェアは、ライセンスに基づき提供されており、それらのライセンス条項に従う場合のみ使用または複製することができます。

権利の制限

米国政府の制限付き権利について: 連邦政府に付与されるソフトウェアおよび技術データに係る権利は、エンドユーザーのお客様に通常提供されている権利に限定されています。Agilent は、ソフトウェアおよび技術データに係る通例の本商用ライセンスを、FAR 12.211 (Technical Data) および 12.212 (Computer Software)、並びに、国防総省に対しては、DFARS 252.227-7015 (Technical Data - Commercial Items) および DFARS 227.7202-3 (Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation) の規定に従い提供します。

購入者への通知

本製品は、Bio-Rad Laboratories と Agilent Technologies Inc. との間の契約に基づき提供されており、本製品の製造、使用、販売、輸入は、Bio-Rad Laboratories, Inc. が所有する米国特許 No. 6,627,424 および欧州特許 No.1 283 875 81 の対象となります。本製品の購入により、購入金額分の製品および製品コンポーネントを研究分野 (法医学、動物実験、食品検査を含むがこれらに限定されないすべての応用研究分野) での PCR (リアルタイム PCR を除く) と、診断分野および予後予測分野でのリアルタイム PCR で使用する譲渡不能な権利が付与されます。すべての応用研究分野を含む研究分野 (法医学、動物実験、食品検査を含むがこれらに限定されない) でのリアルタイム PCR に本製品を使用する権利は付与されません。

安全にご使用いただくために

注意

注意は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、製品の破損や重要なデータの損失に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、**注意**を無視して先に進んではなりません。

警告

警告は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、人身への傷害または死亡に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、**警告**を無視して先に進んではなりません。

このガイドについて

このガイドでは、Magnis NGS Prep System を使用して SureSelect^{XT HS} ターゲットエンリッチメント済み Illumina 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自動的に調製する手順について説明します。

SureSelect^{XT HS} システムは、Illumina プラットフォームでの高感度シーケンシングを可能にするためのターゲットエンリッチメントの前に、分子バーコードを使用してインデックス付きライブラリサンプルを調製するために使用します。

- 1 始める前に
- 2 Magnis NGS Prep System を使用したシーケンシングライブラリの調製
- 3 付録1: DNA サンプル調製ガイドライン
- 4 付録2: ラン実行時にプローブを分注する probe ストリップの使用
- 5 付録3: ラン完了後の NGS 用 DNA サンプル処理のガイドライン
- 6 リファレンス

バージョン C0 の最新情報

- Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits での *LT-SSEL XTHS-RevB-ILM* プロトコルの使用に対応。設定中に、使用する試薬キットの仕様および他のワークフローパラメータに適合するプロトコルを選択する方法については、[26 ページ](#)をご覧ください。また、[79 ページ](#)のトラブルシューティングもご覧ください。
- 空の probe input ストリップが付属する Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (型番 G9730D) は現在使用できません。11 ページの[表 1](#) および 67 ページの[表 16](#) の、対応する Magnis Reagent Kits リストの更新内容をご覧ください。G9730D 試薬キットで設定されたラン処理のための *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM* プロトコルの使用に関する情報を、26 ページの[表 7](#) および [51 ページ](#) ~ [53 ページ](#) の「[付録 2: ラン実行時にプローブを分注する probe ストリップの使用](#)」から削除。Magnis Reagent Kit と利用可能なプロトコルの最新情報については、[Agilent.com](#) をご覧ください。

バージョン B0 の最新情報

- Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits が *SSEL XTHS-RevB-ILM* プロトコルを使用した処理に対応。Rev B 試薬キットは、仕様が変わったコンポーネント (Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM および Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format) を含み、RevB プロトコルを使用する必要があります。Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit のコンポーネントの詳細については、[67 ページ](#)から [69 ページ](#)をご覧ください。本書の手順はまた、元の仕様の試薬キットを使用するサンプル処理にも対応しています。Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (元の仕様) のコンポーネントの詳細については、[70 ページ](#)から [72 ページ](#)をご覧ください。本書がサポートする Reagent Kits の一覧は、11 ページの[表 1](#) を参照してください。現在の Reagent Plate および Probe Plate の設定方法については、[24 ページ](#)から [23 ページ](#)を参照してください。ラン実行の設定中に試薬キットの仕様と互換性のあるプロトコルを選択する方法については、[26 ページ](#)をご覧ください。
- 2020 年 8 月から新しくなったカスタムデザインの設計と製造プロセスにより作成されたカスタムプローブに対応。2020 年 8 月以降に新しくデザインされたカスタムのプローブは、すべて新しい製造プロセスにより製造されます。2020 年 8 月より前に作成された、既存のカスタムデザインのプローブは、従来の製造プロセスにより製造されます。Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits に付属されているプローブの型番は、68 ページの[表 18](#) をご覧ください。元の仕様の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits に付属されているプローブの型番は、70 ページの[表 25](#) をご覧ください。
- Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits (Human All Exon V8 Probe 付属) に対応 (11 ページの[表 1](#)、67 ページの[表 16](#)、68 ページの[表 18](#))。
- Reagent Plate の解凍手順や、ホイルカバー、粘着カバー、プレートスリーブ取り扱いなどの詳細を含む、[22 ページ](#)から [23 ページ](#)のキットコンポーネントの取り扱い方法の更新。
- [32 ページ](#)から [33 ページ](#)に記載の、チラーモジュールの充填手順への小規模な更新。
- 湿度計装置を 12 ページの[表 2](#)に記載の[必要な機器](#)のリストに追加し、[20 ページ](#)に記載の装置設定手順に湿度測定手順を追加。
- スイングバケット遠心分離機 (12 ページの[表 2](#))、および 1X Low TE Buffer、Qubit Fluorometer (13 ページの[表 3](#)) の情報を更新。
- Agilent 5200 Fragment Analyzer を使用したライブラリ QC のサポート (13 ページの[表 3](#)の脚注および [55 ページ](#)の注意事項をご覧ください)
- [51 ページ](#)から [53 ページ](#)の「[付録 2: ラン実行時にプローブを分注する probe ストリップの使用](#)」を更新。更新内容には、*SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM* のプロトコルのサポートと、空の

probe input ストリップ (EPIS) を付属する Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit を使用したラン実行の設定内容が含まれます。

- プロトコルアクセスの情報、ストリップチューブの配置、プロトコルおよびラボウェアの不一致における *Verify Labware* のインジケータを含め、[78 ページ](#)のトラブルシューティングを更新。
- [9 ページ](#)に適合するシーケンシングプラットフォームの説明を追加、59 ページの[表 15](#) のイルミナ社シーケンシングキットガイドラインを更新。
- エチレングリコールの情報を 14 ページの[表 6](#)から削除。DNA せん断設定手順での関連する更新内容については、[44 ページ](#)および[49 ページ](#)をご覧ください。
- D1000 ScreenTape の情報を、14 ページの[表 6](#)に追加。
- テクニカルサポートの連絡先情報の更新 ([2 ページ](#)を参照)。

目次

1	始める前に	8
	ワークフローの概要	9
	安全にご使用いただくために	10
	必要な機器・消耗品	11
	SureSelect XT HS Magnis Prep System でのラン実行に必要な機器・消耗品	11
	DNA サンプル調製および分析に必要な機器・消耗品	13
	オプションの機器・消耗品	14
2	Magnis NGS Prep System を使用したシーケンシングライブラリの調製	15
	重要なサンプルトラッキングの情報	16
	Magnis Sample Input Strip ウェルでのサンプルの配置	16
	Magnis ソフトウェア上でウェル位置に対するサンプル情報を割り当てる方法	17
	ランに使用する DNA サンプルの調製	19
	ラン実行のための Magnis 装置および試薬の準備	20
	ステップ 1. プロトコルを実行するための装置の準備	20
	ステップ 2. SureSelect ^{XT HS} 試薬とプラスチック器具の準備	22
	ライブラリ調製プロトコルの実行	25
	ステップ 1. プロトコルの開始とラン情報の入力	26
	ステップ 2. デッキの設定	28
	ステップ 3. ラボウェアの確認	35
	ステップ 4. サンプル情報の入力	37
	ステップ 5. ラン設定の確認と実行の開始	38
	ステップ 6. 装置からの最終的なライブラリサンプルの収集	40
	ステップ 7. ラン終了後の装置の片付け	42
3	付録 1: DNA サンプル調製ガイドライン	43
	I. Magnis でのラン用の高品質 DNA サンプルの調製	44
	ステップ 1. ゲノム DNA サンプルの調製、定量、品質確認	44
	ステップ 2. DNA のせん断	44
	II. Magnis でのラン用の FFPE 由来 DNA サンプルの調製	47
	ステップ 1. FFPE サンプルからのゲノム DNA の調製	47
	ステップ 2. FFPE DNA サンプルの品質確認と定量	47
	ステップ 3. FFPE DNA サンプルのせん断	49

4	付録2: ラン実行時にプローブを分注する probe ストリップの使用	51
	ラン実行時に probe ストリップにプローブを分注する手順	52
	ラン実行設定時の Magnis ソフトウェア上での Probe (プローブ) 情報入力	53
5	付録3: ラン完了後の NGS 用 DNA サンプル処理のガイドライン	54
	ステップ 1. ライブラリ DNA サンプルの定量とサイズ確認	55
	ステップ 2. マルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール (オプション)	57
	ステップ 3. シーケンシングサンプルの調製	58
	ステップ 4. シーケンシングの開始とデータ解析	60
	HiSeq/NextSeq/NovaSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン	60
	MiSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン	62
	データ解析リソース	65
6	リファレンス	66
	Reagent Kit の内容	67
	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit の内容	67
	Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (元の仕様) の内容	70
	SureSelect XT HS インデックスの参考情報	73
	プレート位置情報	73
	Index (インデックス) の塩基配列	75
	インデックス ID のラン実行後のトラッキング	76
	トラブルシューティングガイド	77

1

始める前に

- ワークフローの概要 9
- 安全にご使用いただくために 10
- 必要な機器・消耗品 11
 - SureSelect XT HS Magnis Prep System でのラン実行に必要な機器・消耗品 11
 - DNA サンプル調製および分析に必要な機器・消耗品 13
 - オプションの機器・消耗品 14

この章に記載されている情報をお読みになり、よく理解したうえで作業を始めてください。

ワークフローの概要

Magnis NGS Prep System を使用した SureSelect^{XT HS} Target Enrichment のワークフローの概要を図 1 に示します。せん断されたゲノム DNA サンプルと、プレートに充填された試薬・ラボウェアを装填した後は、Magnis NGS Prep System が SureSelect^{XT HS} ライブラリ調製およびターゲットエンリッチメントの全ての作業工程を実施します。Magnis NGS Prep System のランが完了した後は、マルチプレックス NGS のためにターゲットエンリッチメント済みのライブラリをプールして、Illumina HiSeq、MiSeq、NextSeq 500 または NovaSeq 6000 シーケンサを使用したシーケンス分析を行うことができます。

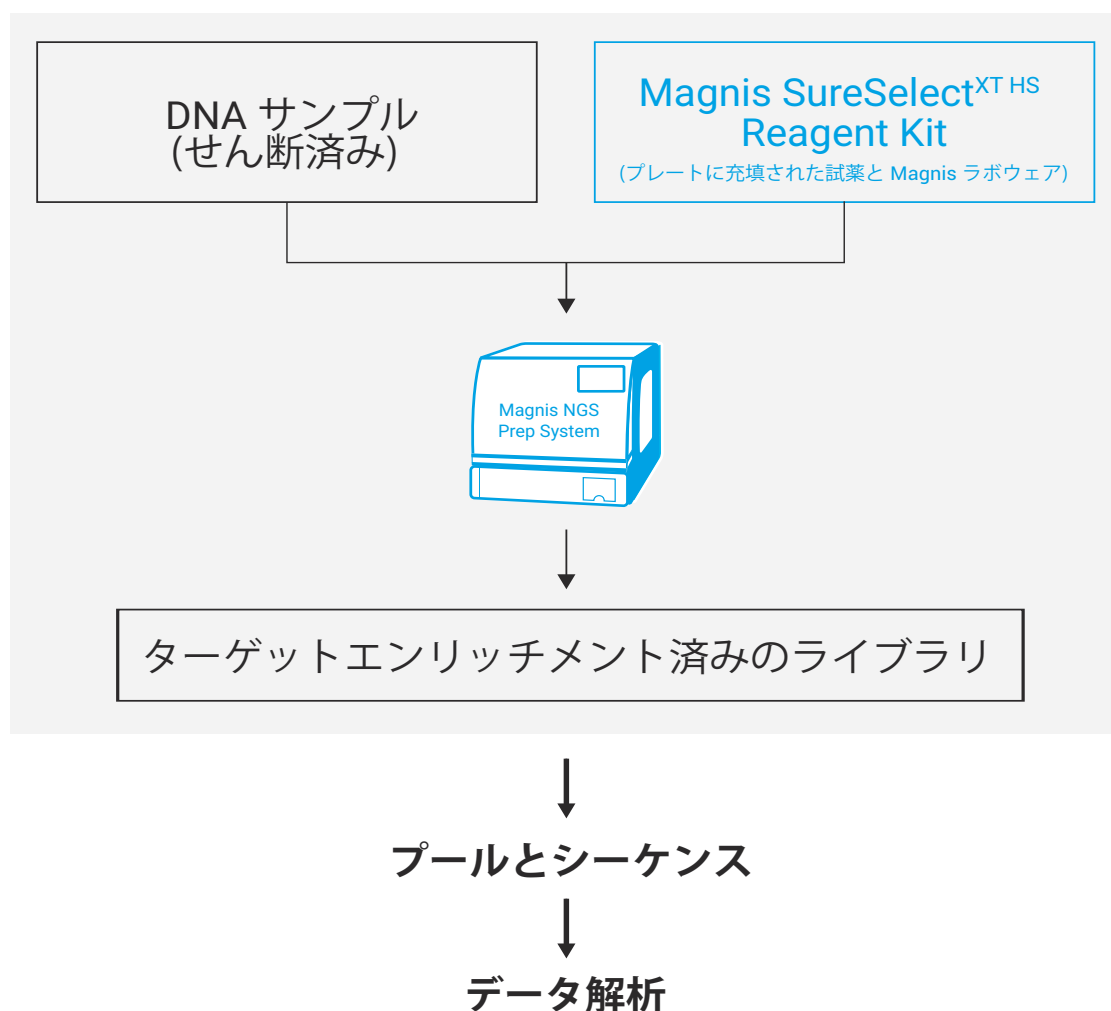


図 1 Magnis NGS Prep System による NGS サンプル調製の全体的なワークフロー。

安全にご使用いただくために

注意

実験室での作業中は、適切な個人用保護具 (PPE) を着用してください。

紫外線 (UV) への曝露の危険性

Magnis 装置ドアとサイドパネルは UV を通さないため、UV への曝露は最小限に抑えられます。ただし、以下の予防措置が必要です。

- UV ランプによる装置デッキの汚染除去中は、UV 光源を直接または間接的に見ないでください。
- 汚染除去を行う際は、必ず装置ドアを閉じてロックしてください。装置ドアは、UV ランプの点灯中はロックされるようにプログラムされています。
- 交換用 UV チューブは Agilent から入手し、Agilent エンジニアまたは Agilent 認定サービスプロバイダが取り付けする必要があります。

火傷の危険性

- プロトコルの実行中に、サーマルサイ클ーモジュールのサーマルブロックやその他のコンポーネントは、短時間で 50 °C を超える温度に達します。安全を確保するために、実行中は装置ドアを閉じたままにしておく必要があります。装置は、プロトコルの実行中はドアをロックするようにプログラムされています。
- Magnis NGS Prep System での使用を意図した Agilent 製の機器・消耗品 (プレート、粘着シール、ホイル、マット) のみを使用してください。これらの機器・消耗品には、十分な温度安定性 (最高 120 °C) があります。

必要な機器・消耗品

SureSelect XT HS Magnis Prep System でのラン実行に必要な機器・消耗品

表 1 サポートされている試薬キット (いずれか 1 つを選択)

説明	96 反応*	32 反応†
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit:	Agilent	Agilent
Tier 1 (1 ~ 499 kb) Probe 付属	p/n G9731D	p/n G9731C
Tier 2 (0.5 ~ 2.9 Mb) Probe 付属	p/n G9732D	p/n G9732C
Tier 3 (3 ~ 5.9 Mb) Probe 付属	p/n G9733D	p/n G9733C
Tier 4 (6 ~ 11.9 Mb) Probe 付属	p/n G9734D	p/n G9734C
Tier 5 (12 ~ 24 Mb) Probe 付属	p/n G9735D	p/n G9735C
Human All Exon V7 Probe 付属	p/n G9771D	p/n G9771C
Human All Exon V8 Probe 付属	p/n G9772D	p/n G9772C
キットの内容のリストについては、 67 ページ ~ 69 ページ をご覧ください。		
または		
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (元の仕様):	Agilent	Agilent
1 ~ 499 kb Probe 付属	p/n G9731B	p/n G9731A
0.5 ~ 2.9 Mb Probe 付属	p/n G9732B	p/n G9732A
3 ~ 5.9 Mb Probe 付属	p/n G9733B	p/n G9733A
6 ~ 11.9 Mb Probe 付属	p/n G9734B	p/n G9734A
12 ~ 24 Mb Probe 付属	p/n G9735B	p/n G9735A
Human All Exon V7 Probe 付属	p/n G9771B	p/n G9771A
空の Magnis Probe Input Strips 付属‡	p/n G9730B	販売なし
キットの内容のリストについては、 70 ページ ~ 72 ページ をご覧ください。		

* 96 反応キットは、1 回のランあたり 8 サンプルを処理し、12 回のランに対応しています。

† 32 反応キットは、1 回のランあたり 8 サンプルを処理し、4 回のランに対応しています。

‡ プローブは別途購入する必要があります。ラン実行時に、空の Magnis Probe Input Strip にプローブを分注する手順については、[52 ページ](#)をご覧ください。

表 2 必要な機器

説明	ベンダーおよび型番
Magnis NGS Prep System*	Agilent p/n G9710AA
Magnis Automation Tips (滅菌、フィルター付き、250 µl)	Agilent p/n G9477G
湿度計	トラッキング可能な温度/湿度データロガー、Cole-Parmer p/n 18004-13 または同等品
ボルテックスミキサー	Vortex Genie-2、VWR p/n 58815-234 または同等品
遠心分離機	Eppendorf 遠心分離機モデル 5417C または同等品†
スイングバケット遠心分離機	A-2-DWP ローターまたは同等品を搭載した Eppendorf 遠心分離機モデル 5804‡
ピペット (容量 10 µl、20 µl、200 µl)	Rainin Pipet-Lite ピペットまたは同等品
滅菌済みでヌクレアーゼフリーのエアロゾルバリア付きピペットチップ	一般的な実験室用品ベンダー
-20 °C および -80 °C に設定された冷凍庫 (2 台)	一般的な実験室用品ベンダー
+4 °C に設定された冷蔵庫	一般的な実験室用品ベンダー
アイスバケット	一般的な実験室用品ベンダー
パウダーフリー手袋	一般的な実験室用品ベンダー

* Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit および本書で詳しく説明されているプロトコルは、Magnis Dx NGS Prep System (p/n K1007AA) と互換性があります。

† 遠心分離機のローターは、Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit に付属のストリップチューブに適合する必要があります。

‡ 遠心分離機のローターは、Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit に付属のディープウェルプレートに適合する必要があります。冷却システムは必要ありません。

DNA サンプル調製および分析に必要な機器・消耗品

表 3 DNA サンプル調製および分析に必要な機器・消耗品 - すべてのサンプルタイプ

説明	ベンダーおよび型番
1X Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.0, 0.1 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific p/n 12090-015 または同等品
Qubit BR dsDNA Assay Kit 100 アッセイ 500 アッセイ	Thermo Fisher Scientific p/n Q32850 p/n Q32853
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific p/n Q33238
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific p/n Q32856
Covaris サンプル調製システム	Covaris モデル E220
Covaris microTUBE サンプルホルダー	Covaris p/n 520045
DNA 分析システムと消耗品: Agilent 4150 TapeStation または Agilent 4200 TapeStation および TapeStation 互換の 8 ウェルチューブストリップ 8 ウェルチューブストリップキャップ High Sensitivity D1000 ScreenTape High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent p/n G2992AA Agilent p/n G2991AA Agilent p/n 401428 Agilent p/n 401425 Agilent p/n 5067-5584 Agilent p/n 5067-5585

* また、Agilent 2100 Bioanalyzer (p/n G2939BA) および High Sensitivity DNA Kit (p/n 5067-2646)、または Agilent 5200 Fragment Analyzer (p/n M5310AA) および HS NGS Fragment Kit (p/n DNF-474-0500) をライブラリ DNA 分析に使用することもできます。

表 4 必要な機器・消耗品 - 高品質 DNA サンプルのみ

説明	ベンダーおよび型番
高品質 gDNA 精製システム、以下例: QIAamp DNA Mini Kit 50 サンプル 250 サンプル	Qiagen p/n 51304 p/n 51306

表 5 必要な機器・消耗品 - FFPE DNA サンプルのみ

説明	ベンダーおよび型番
FFPE gDNA 精製システム、以下例: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit、50 サンプル Deparaffinization Solution	Qiagen p/n 56404 p/n 19093
FFPE DNA 分解度評価システム: Agilent NGS FFPE QC Kit (推奨方法) 16 反応 96 反応 または TapeStation Genomic DNA 分析アッセイ: Genomic DNA ScreenTape Genomic DNA Reagents	Agilent p/n G9700A p/n G9700B Agilent p/n 5067-5365 p/n 5067-5366

* Agilent の 4150 TapeStation または 4200 TapeStation および互換性のあるプラスチック器具も必要です。製品については、上記の表 3 をご覧ください。

オプションの機器・消耗品

表 6 プロトコルのオプション機器・消耗品の製品情報

説明	目的	ベンダーおよび型番
希釈漂白剤 (10%) ワイブ	装置デッキの表面のクリーニング (20 ページ をご覧ください)*	Hype-Wipe Bleach Towelettes (VWR p/n 16200-218) または同等品
アルコール (70%) ワイブ	装置デッキの表面のクリーニング (20 ページ をご覧ください)*	VWR Pre-Moistened Clean Wipes (VWR p/n 21910-110) または同等品
ドライタイプのリントフリー / スクラッチフリーのワイパー	バーコードスキャナの窓の表面クリーニング	Kimwipes ワイパー (VWR p/n 21905-026) または同等品
D1000 ScreenTape および D1000 Reagents	Agilent 4200/4150 TapeStation システムを使用した、オプションのプリキャプチャライブラリ QC サンプルの分析 (41 ページ をご覧ください)	Agilent p/n 5067-5582 および p/n 5067-5583
Tween 20	シーケンシングライブラリの保存 (57 ページ をご覧ください)	Sigma-Aldrich p/n P9416-50ML

* 装置の定期的な汚染除去には、Magnis 装置の UV による汚染除去プログラムの使用をお勧めします。溶剤ベースのクリーニングが必要な場合、装置のユーザーガイドに記載の装置表面クリーニング手順をご覧ください。使用前に、許可されている溶剤をソリッドクロスサポートに塗布する必要があります。水、漂白剤、アルコール、その他の液体を装置内部に吹き付けしないでください。液体が装置コンポーネントの内部に入り込まないように、洗浄剤を染み込ませた布から余分な水分を取り除いてから使用してください。

2

Magnis NGS Prep System を使用したシーケンシング ライブラリの調製

重要なサンプルトラッキングの情報	16
Magnis Sample Input Strip ウェルでのサンプルの配置	16
Magnis ソフトウェア上でウェル位置に対するサンプル情報を割り当てる方法	17
ランに使用する DNA サンプルの調製	19
ラン実行のための Magnis 装置および試薬の準備	20
ステップ 1. プロトコルを実行するための装置の準備	20
ステップ 2. SureSelect ^{XT HS} 試薬とプラスチック器具の準備	22
ライブラリ調製プロトコルの実行	25
ステップ 1. プロトコルの開始とラン情報の入力	26
ステップ 2. デッキの設定	28
ステップ 3. ラボウェアの確認	35
ステップ 4. サンプル情報の入力	37
ステップ 5. ラン設定の確認と実行の開始	38
ステップ 6. 装置からの最終的なライブラリサンプルの収集	40
ステップ 7. ラン終了後の装置の片付け	42

この章では、Magnis NGS Prep System を使用して SureSelect^{XT HS} ターゲットエンリッチメント済み DNA シーケンシングライブラリを調製する手順について説明します。ワークフローの概要については、9 ページの図 1 をご覧ください。

ここでは、ラン実行の際に Magnis NGS Prep System 装置およびアッセイコンポーネントを準備して、Magnis 装置のプロトコルを実行し NGS ライブラリサンプル調製する手順について詳しく説明します。

シーケンシングする各サンプルについて、サンプルインデックスおよび分子バーコードが付加したライブラリが、それぞれ調製されます。ここで説明するプロトコルを使用して調製されたライブラリは、Illumina ペアリードシステムを使用したシーケンシングに対応しています。

重要なサンプルトラッキングの情報

正確なサンプルトラッキングは、シーケンシング結果の解釈に不可欠です。ラン実行を開始する前に、このセクションのサンプルトラッキングの情報をよく読んで、1) Magnis Sample Input Strip ウェルでのサンプル番号の配置や、2) ラン実行の設定時の Magnis ソフトウェアでのサンプル ID の入力方法などを理解しておいてください。

Magnis Sample Input Strip ウェルでのサンプルの配置

Magnis NGS Prep System でのランにおけるサンプルの配置は、下の図 2 のようになります。この図では、Magnis Sample Input Strip の Barcode (バーコード) から最も離れたところにあるウェルにサンプル 1 を装填しています。22 ページのランの実行を準備する際は、このような配置で Magnis Sample Input Strip ウェルにサンプルを装填する必要があります。

ラン実行の準備前に、各サンプルに 1 から 8 までの固有のサンプル番号を割り当て、サンプル番号の割り当て内容を記録しておきます。ランに用いるサンプルの割り当てを Magnis ソフトウェアに入力する方法については、17 ページ～18 ページの説明をご覧ください。

注意

Magnis Sample Input Strip の Barcode (バーコード) が読み取れなくなるような書き込みをしたり、ラベルを貼り付けたりしないでください。

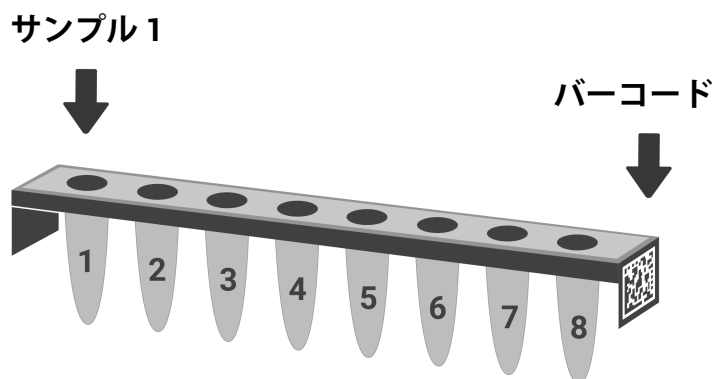


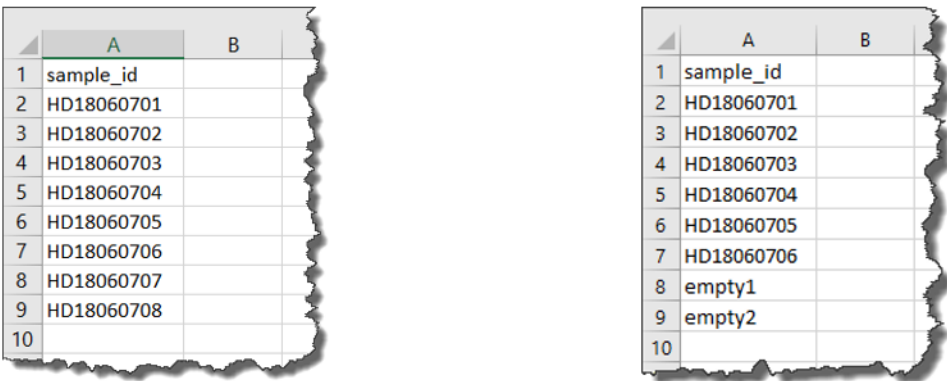
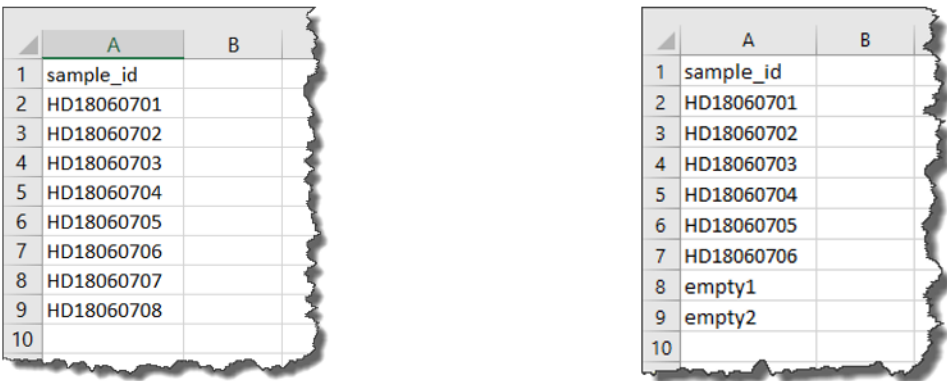
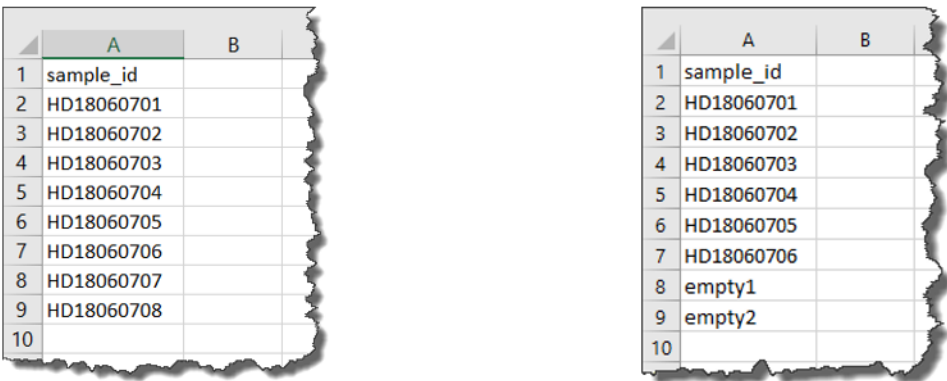
図 2 Magnis Sample Input Strip でのサンプル番号 1～8 の必要な配置。

Magnis ソフトウェア上でウェル位置に対するサンプル情報を割り当てる方法

ランに含まれる各サンプルの ID は、以下の 2 つの方法のいずれかに従って、Magnis 装置のソフトウェアで入力する必要があります。ランに含まれる固有のサンプル ID を、37 ページの「[ステップ 4. サンプル情報の入力](#)」セクションの説明に従って、ラン実行の設定時に Magnis システムに入力します。ラン実行の設定を開始する前に、サンプルの配置とトラッキングに関する以下の情報をご確認ください。

各サンプル ID は 1～30 文字にする必要があり、1 つのラン内で一意でなければなりません。サンプル ID は別のランで再利用することができます。

サンプル割り当て方法 1: .csv ファイルを使用したサンプル割り当てのインポート

- 1 サンプル名が順番に入力された .csv (カンマ区切り値) ファイルを作成します。サンプル名のデータは、Microsoft Excel ソフトウェアなどのスプレッドシートアプリケーションを使用して表形式で入力し、.csv 形式で保存できます。
- a のように、セル A1 に「sample_id」というヘッダーテキストを入力します。
- b セル A2～A9 に各サンプルの名前を入力します (の左側のパネルをご覧ください)。サンプル入力ファイルには、固有のサンプル ID が 8 つ含まれている必要があります。いずれかのサンプルウェルを空のままにしてランを実行する場合は、対応する位置にプレースホルダーテキストを入力する必要があります (の右側のパネルをご覧ください)。

8 つのサンプルがランに含まれる場合

	A	B
1	sample_id	
2	HD18060701	
3	HD18060702	
4	HD18060703	
5	HD18060704	
6	HD18060705	
7	HD18060706	
8	HD18060707	
9	HD18060708	
10		

6 つのサンプルがランに含まれ、2 つのサンプル ID にプレースホルダーを入力した場合

	A	B
1	sample_id	
2	HD18060701	
3	HD18060702	
4	HD18060703	
5	HD18060704	
6	HD18060705	
7	HD18060706	
8	empty1	
9	empty2	
10		

図 3 サンプル割り当てをアップロードするための .csv ファイルの内容の例 (スプレッドシート形式で表示)

- 2 ファイルを .csv 形式で保存します。
- 3 暗号化されていない USB ディスクに .csv ファイルをダウンロードします。
- 4 ラン実行を設定する際は、Enter Sample Info 画面で、下図のサンプルアップロードボタンを押し、プロトコル設定ウィザードのプロンプトに従って USB ディスクからサンプル ID を転送します。



サンプル割り当て方法 2: Magnis 装置のタッチスクリーンを使用した手動でのサンプル割り当て

- 1 Magnis Sample Input Strip ウェルにサンプルを分注する前に、適切なハードコピーまたはソフトコピーによる記録手段を使用して、ランに用いる各サンプル番号の ID を記録します。
- 2 ラン実行を設定する際は、Magnis タッチスクリーンのプロンプトに従って、下図の *Enter Sample Info* 画面で各サンプルウェル位置の Sample ID を入力します。Magnis システムによって、各サンプル位置にデフォルトの Sample ID が自動的に割り当てられます。Sample ID を変更するには、タッチスクリーンで特定のサンプル位置を選択し、右側の **Edit Sample ID** ツールを使用して目的の Sample ID テキストを入力します。**Change** を押して、サンプルに対して入力した Sample ID テキストを保存します。

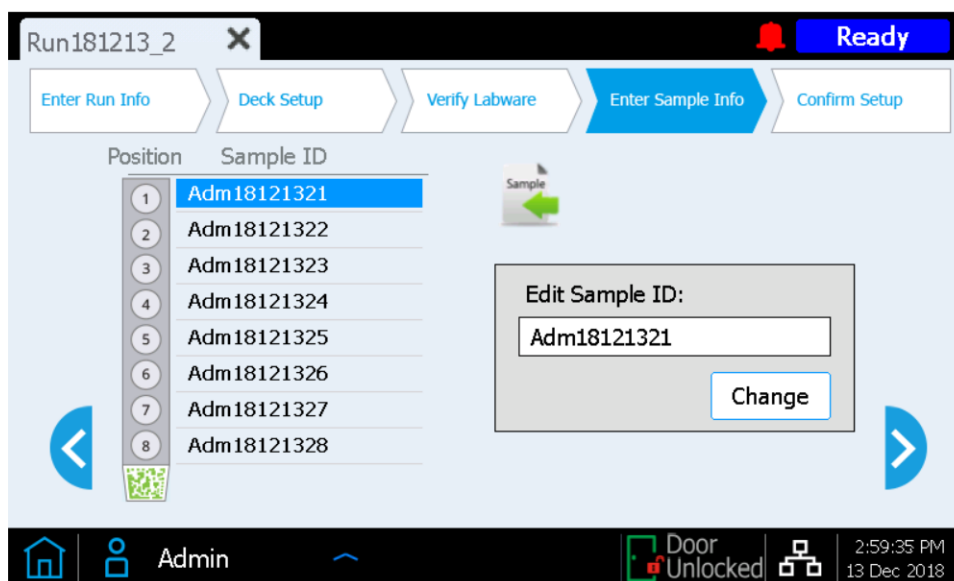


図 4 ラン実行の設定中に手動でサンプルを割り当てするときの Magnis タッチスクリーンインターフェイス。

ランに使用する DNA サンプルの調製

ライブラリ調製プロトコルは、新鮮サンプルまたは新鮮凍結サンプルから調製された高品質 gDNA と、FFPE サンプルから調製された低品質 DNA の両方に対応しています。高品質の DNA または FFPE 由来の DNA のいずれを処理するランでも、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng のインプット DNA 量で実施可能です。シーケンシングで最適な結果を得るには、この範囲内で使用可能な最大量のインプット DNA を使用してください。同一ラン内で使用するすべてのサンプルは同量で用意する必要があります。

Magnis でのラン実行を設定する前に、43 ページの「[付録 1: DNA サンプル調製ガイドライン](#)」に記載されているガイドラインおよびプロトコルを使用して、DNA サンプルの調製、定量、品質確認、せん断を行う必要があります。DNA サンプル調製プロトコルの一部 (特に FFPE 由来のサンプルの品質確認) は、Magnis でのラン実行の手順を開始する前日までに完了する必要があります。ただし、DNA サンプルは、ランで使用する直前にせん断し、input DNA sample ストリップチューブに分注する必要があります。

以降のページの Magnis NGS Prep System の設定手順を開始する前に、[43 ページ](#)からの DNA サンプル調製手順を確認して、gDNA サンプルと Covaris E220 装置がラン実行時に使用できるよう準備しておきます。

メモ

Covaris E220 装置での DNA せん断の準備には、ウォーターバスを冷却して脱気するために約 30～60 分かかります。これらの調整手順 ([44 ページの手順 1](#) をご覧ください) を行ってから、以降のページの Magnis NGS Prep System および試薬の準備手順を開始してください。

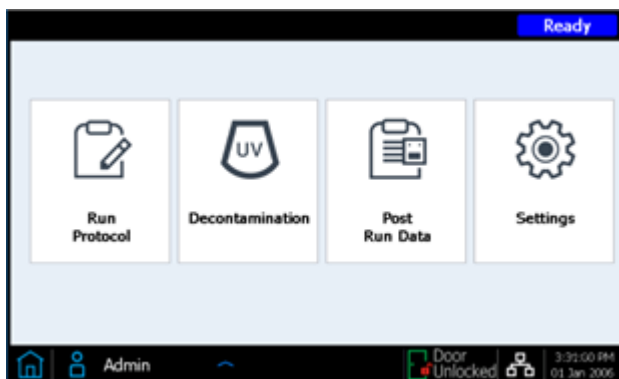
ラン実行のための Magnis 装置および試薬の準備

ステップ 1. プロトコルを実行するための装置の準備

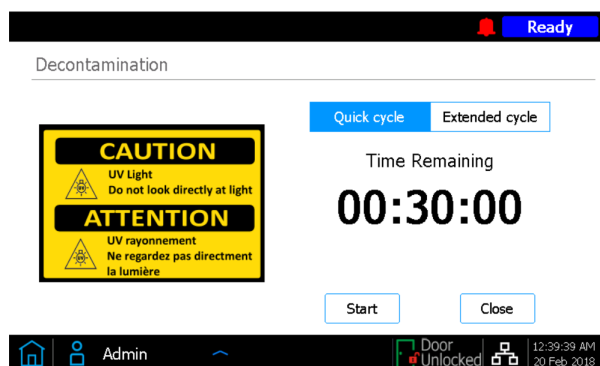
メモ

以下の手順には、紫外線 (UV) を使用して装置デッキを汚染除去するための、装置を介した汚染除去手順が含まれています。自動 UV 汚染除去手順に加えて、またはこの手順の代わりとして、その他の汚染除去手順 (10% 漂白液の使用など) を行ってもかまいません。装置表面の汚染除去とクリーニングの詳しい手順については、Magnis システムのユーザーガイドをご覧ください。

- 1 始める前に、湿度計を使用して Magnis 装置周囲の湿度を測定します。非凝結湿度が 30 % から 70 % の許容範囲にあることを確認します。
- 2 以前のラン実行時のラボウェアやその他の残留物が装置デッキからすべて片付けられていることを確認します。ラン実行の設定中に装置デッキに何らかの物質が存在すると、装置の起動プロセスや設定プロセスの妨げとなる可能性があります。
- 3 装置前面の電源ボタンを押して、装置の電源を入れます。装置ドアを閉めます。
装置の電源が入り、装置内部の LED インジケータライトが点灯し、タッチスクリーンでソフトウェアが起動します。
一連の起動アクティビティがシステムで実行される間、待機します。これには数分かかる場合があります。
- 4 Agilent では、毎回のラン実行前に以下の手順に従って、UV 汚染除去の *Quick cycle* 手順 (所要時間 30 分) を実行することをお勧めします。
 - a Home 画面で **Decontamination** を押します。



- b Decontamination 画面で **Quick cycle** を押し、**Start** を押します。Quick cycle 汚染除去手順の所要時間は 30 分です。UV 汚染除去手順の間、LED インジケータライトが消えて、装置の UV ランプチューブから紫外線が照射されます。



警告

汚染除去中に UV ランプを直視しないでください。

メモ

30 分の汚染除去作業の間に、22 ページの説明に従って試薬調製手順を始めてください。

- 5 汚染除去サイクルが完了すると、装置の LED インジケータライトが青色に点灯します。タッチスクリーン画面を使用して Home 画面に戻り、実行設定手順にアクセスします。

ステップ 2. SureSelect^{XT} HS 試薬とプラスチック器具の準備

プレートとストリップチューブの取り扱い方法

ラン実行の準備を開始する前に、以下の重要なラボウェア取り扱い方法を十分にご確認ください。

- Magnis Sample Input Strip (プレート型で提供されている赤色のストリップ、型番 5190-9882 または 5191-5676) は、ランに使用するすべての DNA サンプルの調製試薬および希釈試薬とともに、必ず実験室の PCR 前エリアにのみ保管し、そこでのみ使用してください。空の Magnis Probe Input Strip (型番 5190-9883、型番 G9730B のキットにのみ付属) も、PCR 前エリアに保管し、そこで充填してください。
- キットプレートとストリップチューブを覆っている粘着シールおよびホイルは、ラン実行の設定中とラン実行中はそのままにしておく必要があります。ラン実行の設定中、ホイルカバーおよび粘着カバーに触れたり傷を付けたりしないでください。ラン実行の設定中に sample input strip のホイルカバーに穴が開いた場合は、キットに付属している新しいホイルシールストリップでウェルを再度密封する必要があります。交換用のホイルシールを汚したり傷を付けたりしないように注意してください。
- 充填済みの試薬プレート (Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate と Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate の両方) は、白い厚紙のスリーブに入っています。以下に説明するすべての調製手順の間、充填済みプレートをスリーブに入れたままにしてください。プレートウェルを目視で検査するときは、ホイルカバーまたは粘着カバーを曲げたり傷を付けたりしないように、試薬プレートをスリーブから注意深く、**部分的にのみ**スライドさせます。スリーブへのプレートの再挿入が不適切な場合、プレートに傷がつく可能性があります。
- 下の写真のように次の手順に従って、充填済みの試薬プレートをボルテックスします。ボルテックス中は、スリーブに入ったプレートを水平に寝かせるのではなく、垂直に立てておきます。まず、プレートの長手側をボルテックスヘッドに押し当て、10 秒間攪拌します。次に、プレートを 90 度回転させ、プレートの短手側をボルテックスヘッドにさらに 10 秒間押し当てます。プレートの 4 辺すべてが完了するまで、回転と 10 秒間の攪拌のシーケンスを続けます。



- キットの開梱中またはラン実行の設定中にキットコンポーネントが破損したと思われる場合 (ホイルカバーまたは粘着カバーに穴が開いた、プラスチック器具が壊れたなど)、そのコンポーネントの使用を中止し、Agilent サポートにお問い合わせください。

サンプルと試薬の設定手順

- 1 次の手順に従い、ラン実行用に **Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate** を準備します。
 - a プレートを白い厚紙のスリーブに入れたまま、1 つの Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate を +4 °C の保管庫から室温に移し替えます。ランで使用する前に、スリーブに入ったプレートを室温に戻してください (30 分以上)。
 - b 上記の取り扱い方法のセクションで説明したように、スリーブに入ったプレートを垂直に立てた状態でボルテックスします。
 - c 250 × g に設定した遠心分離機で、スリーブに入ったプレートを 3 秒間 (遠心分離機がフルスピードに達してから 3 秒間) 遠心し、ビーズをペレット化させないように液体を回収します。ビーズのペレット化を防ぐために、推奨される遠心速度と時間を超えないようにしてください。
 - d スリーブに入ったプレートを室温に置いておきます。同日中に使用してください。

2 次の手順に従い、**Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM** または **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate ILM** を準備します。

- a プレートを白い厚紙のスリーブに入れたまま、1つの Reagent Plate を -20 °C の保管庫から室温に移し替えます。試薬を 15～30 分間室温で解凍します。スリーブからプレートを部分的にスライドさせて取り出し、試薬が完全に解凍されていることを目視で確認します。
- b ウェルの内容物が解凍されたら、上記の取り扱い方法のセクションで説明したように、スリーブに入ったプレートを垂直に立てた状態でボルテックスします。
- c $250 \times g$ に設定した遠心分離機で、スリーブに入ったプレートを 1 分間 (遠心分離機がフルスピードに達してから 1 分間) 遠心します。プレートウェルの底部に気泡がないかどうかを確認し、気泡がある場合は、すべての気泡が放出されるまで遠心を繰り返します。
- d スリーブに入ったプレートを氷上に置きます。同日中に使用してください。

3 次の手順に従って、**Magnis Sample Input Strip** に DNA サンプルを調製します。

- a Covaris E220 装置を DNA せん断手順で使用する準備ができていることを確認します。その際、ウォーターバスは [44 ページ](#) または [49 ページ](#) の説明に従って 5 °C に冷却され、脱気されている必要があります。
- b 室温の保管庫から Magnis Sample Input Strip キットを取り出します。空の赤色の Sample Input Strip (ストリップの端に「S」と刻印されている) をプレートサポートから 1 つ取り外し、ホイルカバーはそのままだしておきます。[手順 d](#) で再度密封するために、新しいホイルシールストリップを裏紙とともに用意しておきます。
- c DNA サンプルタイプに適した手順に従って、ラン実行に用いる Magnis Sample Input Strip を調製します。高品質 DNA サンプルの場合は、[44 ページ](#)～[46 ページ](#) の手順に従います。FFPE DNA サンプルの場合は、[47 ページ](#)～[50 ページ](#) の手順に従います。

最終的な sample input strip では、各サンプルウェルに 50 μ l のせん断された DNA (10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng) が入っており、ストリップのすべてのウェルで DNA の量が同じある必要があります。

- d すべてのサンプルが Magnis Sample Input Strip ウェルに配置されたら、[手順 b](#) で用意しておいた新しいホイルシールでストリップチューブを再度密封します。その際、ストリップチューブのバーコードがホイルシールで隠れないように注意してください。シールがしっかりと均一に貼られていることを確認し、装置に装填する際に、ストリップチューブの配置を妨げる可能性のある過度の突出や折り目がないことを確認します。
- e 密封したサンプルウェルに気泡がないことを目視で確認します。 $250 \times g$ に設定した遠心分離機で、5 秒間または DNA 溶液から気泡がすべて放出されるまで、調製した sample ストリップを遠心して気泡を取り除きます。
- f [33 ページ](#) で使用するまで、sample ストリップチューブを氷の上に置いておきます。

4 次の手順に従って、**Index (インデックス) ストリップチューブ** を調製します。

- a ランに使用するインデックスの適切なセットを決めます。付属のインデックスストリップチューブには、バーコードの反対側の端に A1、A2、A3、A4 と刻印されており、ウェルに含まれるインデックスの特定のセットを示しています (インデックスの詳細については、[73 ページ](#) をご覧ください)。Magnis NGS ライブラリ調製の複数のランからのサンプルを用いてマルチプレックス NGS を行う場合は、プールするすべてのサンプルが固有のインデックスシーケンスでタグ付けされるように、それらのランで異なるインデックスセットを使用する必要があります。
- b -20 °C の保管庫から Magnis SureSelect XT HS Index Plate を取り出します。適切な黒色のインデックスストリップ (A1、A2、A3、A4 のラベルが付いている) をプレートサポートから取り外し、ホイルカバーはそのままだしておきます。取り外したストリップを氷上に置き解凍し、残りのインデックスストリップがあるプレートを -20 °C の保管庫に戻します。

- c インデックスストリップウェルの内容物が解凍されたら、ストリップを高速で 5 秒間ボルテックスします。
 - d 250 × g に設定した遠心分離機で、インデックスストリップを 5 秒間遠心します。ストリップウェルをチェックして、ウェルの底部に液体が溜まっており、気泡がないことを確認します。すべての気泡が放出されるまで遠心を繰り返して、気泡を取り除きます。
 - e [33 ページ](#)で使用するまで、インデックスストリップチューブを氷上に置きます。
- 5 下記のいずれかの仕様の充填済みの Probe Plate が付属するキットを使用するときは、次の手順に従って、**Probe ストリップチューブ**を調製します。
- Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format (ウェル A には 8 サンプル分のプローブ溶液が充填 (ウェル B から H までは空))。
 - Magnis SureSelect XT HS Probe Plate (8 サンプル分のプローブ溶液は 8 ウェルすべてに分配)
- 充填済みの probe ストリップがキットに含まれておらず (型番 G9730B のキット)、その代わりに、ラン実行時にプローブを分注するための空の probe ストリップが含まれている場合は、次の手順をスキップし、代わりに [52 ページ](#)の手順に従って probe ストリップを調製します。
- a -80 °C の保管庫から Probe Plate を取り出します。白色の probe ストリップ (ストリップの端に「P」と刻印されている) をプレートサポートから 1 つ取り外し、ホイルカバーはそのままにしておきます。取り外したストリップを氷上に置き解凍し、残りの probe ストリップがあるプレートを -80 °C の保管庫に戻します。

注意

probe ストリップには、人間が読める形式で固有のプローブ設計 ID を示すラベルは含まれていません。probe ストリップをプレートの包装から取り外したら、適切な注意を払って probe ストリップ ID をトラッキングおよび維持してください。同時に複数のボックスを開いて、異なるプローブ設計の probe ストリップチューブを取り外さないでください。

メモ

Rev B Reagent Kits に付属の probe ストリップでは、ランに用いられるプローブ溶液の全量が 1 つのウェルに入っており、元の仕様の Reagent Kits に付属の probe ストリップでは 8 つのウェルすべてに分配されています。

- d [33 ページ](#)で使用するまで、probe ストリップを氷上に置きます。
- 6 デッキに配置するために、室温 (RT) の保管庫から Magnis Empty Consumables ボックスを 1 つ取り出します。
- 25 ページの「[ライブラリ調製プロトコルの実行](#)」に進みます。

ライブラリ調製プロトコルの実行

SureSelect XT HS のラン実行用に Magnis 装置とすべての試薬を準備したら、装置のタッチスクリーンに表示されるプロンプトに従って、装置にラボウェアを装填し、ライブラリ調製プロトコルを実行します。この手順の要約を図 5 に示します。

Magnis 装置のタッチスクリーンに表示されるプロンプトにより、ラン実行の情報を入力し、デッキを装填し、すべてのラボウェアの配置と必須プロパティの設定を確認し、サンプル情報を入力し、プロトコル設定を確認します。これらの設定手順の間、装置のデッキ上の LED インジケータライトが白色に点灯します。新規に装置を使用いただく方は、これら各プロンプトについて詳細に示されておりますので、[26 ページ～38 ページ](#)をご覧ください。

プロトコルを実行することで、システムはせん断された DNA サンプルからライブラリ調製とターゲットエンリッチメントを実施し、シーケンシング可能なターゲットエンリッチメント済みの DNA ライブラリを調製します。ランの実行中は、LED インジケータが緑色に点灯します。

ラン実行が完了すると、LED インジケータが青色に点灯し、最終的なシーケンシングライブラリサンプルと QC サンプル (含まれている場合) を装置から回収するためのプロンプトがシステムのタッチスクリーンに表示されます。最終的なターゲットエンリッチメント済みのライブラリを DNA シーケンシング用に処理するためのガイドラインについては、54 ページの「[付録 3: ラン完了後の NGS 用 DNA サンプル処理のガイドライン](#)」をご覧ください。

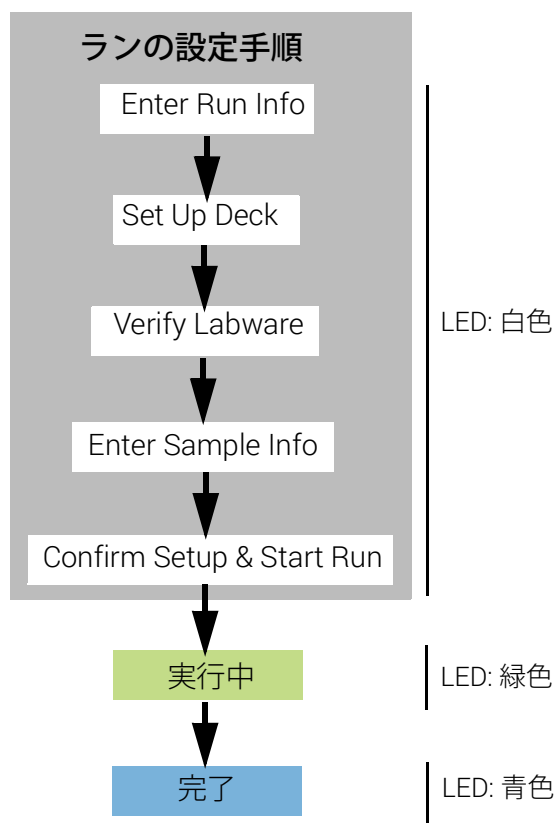
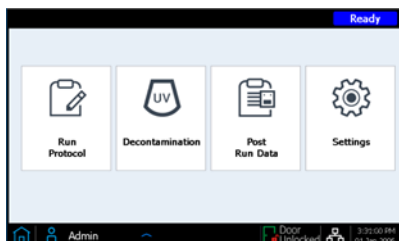


図 5 Magnis NGS Prep System のラン実行の設定から完了までの手順の概要。装置の LED インジケータライトの色が右側に示されています。

ステップ 1. プロトコルの開始とラン情報の入力

- 1 タッチスクリーンの Home 画面で **Run Protocol** を押します。

装置ドアがロックされ、装置健全性チェック (IHC) が実行されます。これには数分かかることがあります。IHC での問題が画面に表示された場合は、77 ページの「[トラブルシューティングガイド](#)」の改善ガイドラインをご覧ください。



- 2 以下の *Enter Run Info* (実行情報の入力) 画面に表示されるプロンプトに従います。最初の画面で、ランに用いるプロトコル名と QC 用ライブラリの回収設定を設定します。
 - a **[Protocol]** メニューを展開し、[表 7](#)の内容に従って、Reagent Kit の仕様に適したプロトコルを選択します。お使いの装置のタッチスクリーンに表示されるプロトコルが、[表 7](#)に記載されるプロトコルとは異なる場合があります (詳細については、77 ページの「[トラブルシューティングガイド](#)」をご覧ください)。

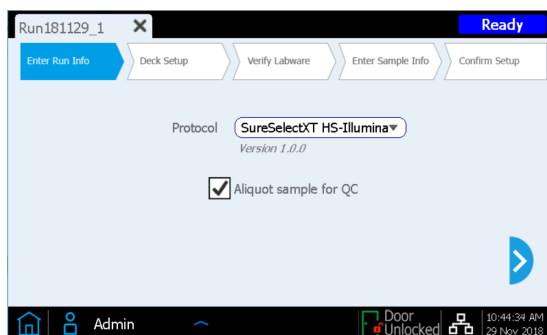
表 7 使用するプロトコルの情報

プロトコル名	適合する試薬キット	使用条件の詳細
SSEL XTHS-RevB-ILM	充填済みの probe input ストリップ (充填済みの Single Well Format) が付属されている Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits	このプロトコルは、SureSelect Human All Exon V7 および V8 プローブならびに SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits に付属するほとんどのカスタムプローブデザインのための、最適なハイブリダイゼーション条件を提供します。
LT-SSEL XTHS-RevB-ILM	充填済みの probe input ストリップ (充填済みの Single Well Format) が付属されている Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits	このプロトコルは、 <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> プロトコルと同等のハイブリダイゼーション条件を提供します。 <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> プロトコルで構築したワークフローのパフォーマンスを維持しつつ、Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits でサンプルを処理する際に使用が推奨されます。また、元々は SureSelect XT システム用にデザインされたカスタムプローブを使用する際にも、使用が推奨されます。
SureSelectXT HS-Illumina	充填済みまたは空の probe input ストリップが付属されている 元の仕様 の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits	元の仕様で提供される Magnis Reagent Kits は、このプロトコルで処理する必要があります。その場合は、 52 ページ に記載されている内容に従い、ラン実行前に空の probe input ストリップにプローブを充填しておく必要があります。

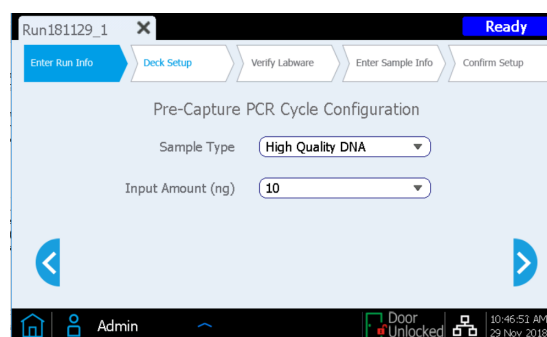
- b オプションとして、ラン実行後 QC 分析のために各ブリキャプチャライブラリサンプルを分取 (3 µl) する場合は、**Aliquot sample for QC** チェックボックスをオンにします。(ブリキャプチャ QC サンプルは、ラン実行全体が完了した後にのみ回収できます。) このチェックボックスをオンにする場合は、[33 ページ](#)のデッキ設定時に青色の QC ストリップを必ず装填してください。

QC 用の分取手順をスキップする場合は、このチェックボックスをオフにします。

- c 右向きの矢印を押して、次の画面に進みます。



- 3 2 番目の画面で、ランで使用するサンプルについて、適切な **Sample Type** (*High Quality DNA* または *FFPE DNA*) と DNA の **Input Amount** (*10 ng*、*50 ng*、*100 ng*、または *200 ng*) を選択します。これらの設定は、ランにおける適切な PCR サイクリング条件を決めるために使用されます。ランに使用される PCR サイクル数やその他の条件は、*Confirm Setup* のステップで表示されます ([38 ページ](#)をご覧ください)。



ステップ 2. デッキの設定

Magnis のタッチスクリーンインターフェイスにより、デッキ設定手順が案内されます。新規に装置を使用いただく方は、**29 ページ～34 ページ**に詳細に示されておりますのでご覧ください。下の画像は、ラン実行の設定が完了したときの Magnis デッキの配置とラン実行用のラボウェアを示しています。

タッチスクリーン画面で示される内容でデッキ設定を行う際は、ラン実行の間にエラーが発生しないように、以下の重要な詳細情報に特に注意を払ってください。

- チップボックスにすべてチップが入っており、プラットフォームに水平に配置されていることを確認します。各チップボックスが、そのプラットフォーム位置にある一段高いタブフレーム内に収まるよう配置されており、蓋を取り外す際にボックスがずれないことを確認します。
- すべてのラボウェアが Barcode (バーコード) を手前 (装置の前面) に向けて配置されていることを確認します。

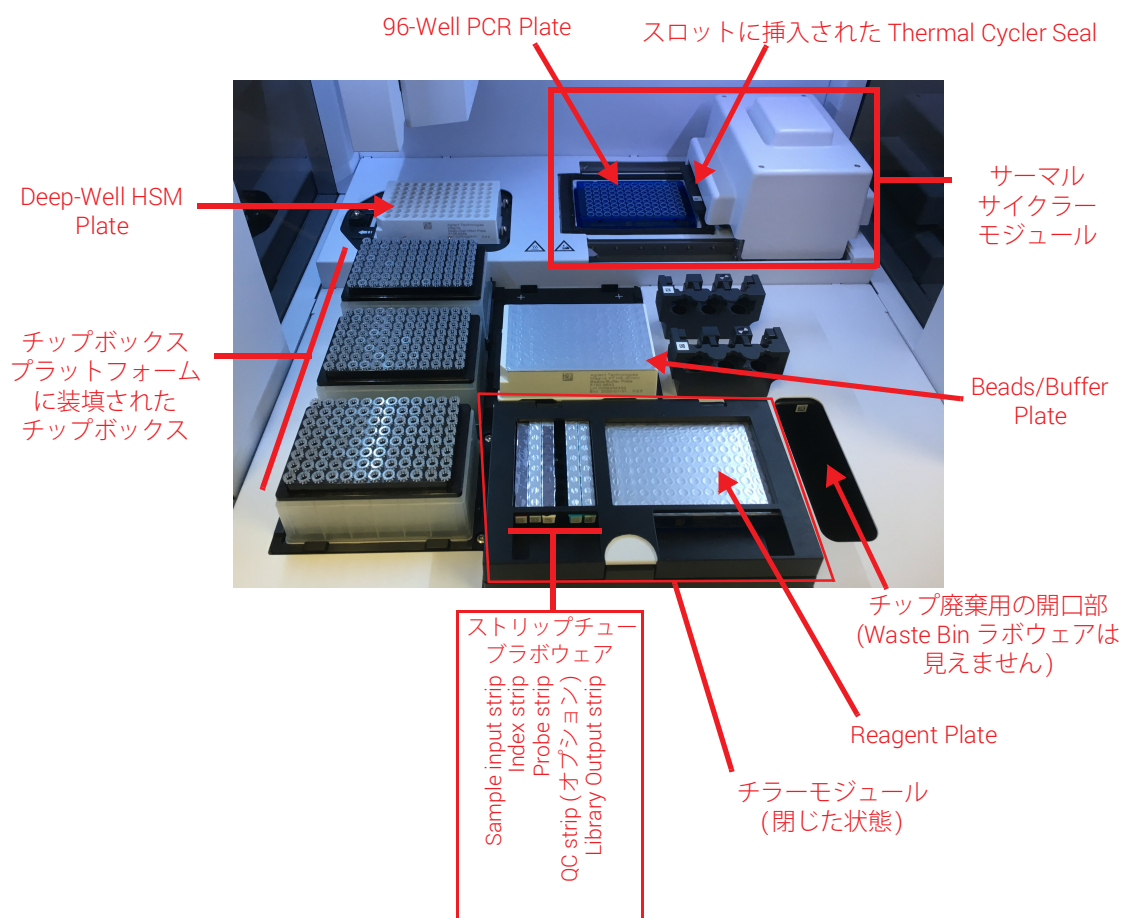
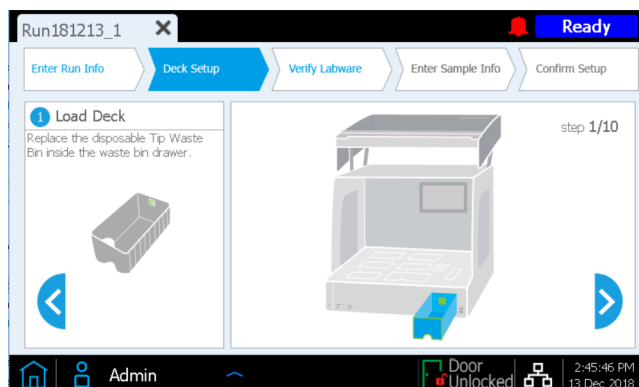


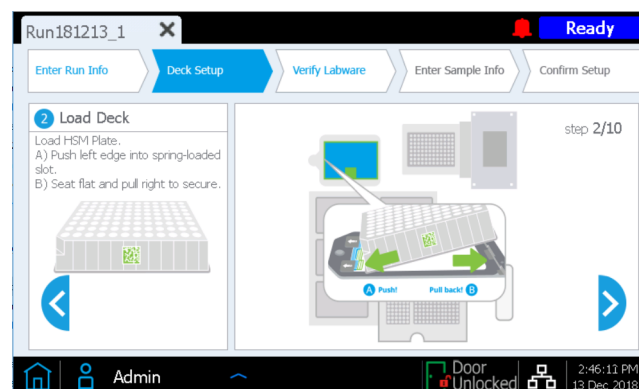
図 6 ラン実行用に装填された装置デッキ

Magnis のタッチスクリーンインターフェイスに表示される *Deck Setup* (デッキの設定) の手順について、以下で詳しく説明します。デッキ装填手順ごとに、装填対象のデッキ位置がタッチスクリーン画面上で青色に表示されます。各手順が完了したら、右向きの矢印を押して次の画面に進みます。

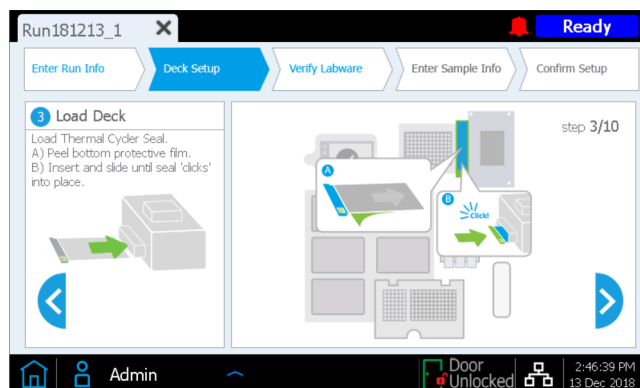
- 1 Magnis Empty Consumables パッケージから使い捨ての Magnis Tip Waste Bin を取り出します。タッチスクリーンに表示されているように、バーコードを手前に向けて、使い捨てのビンを廃棄ビンドロワーに置きます。廃棄ビンドロワーを閉じます。



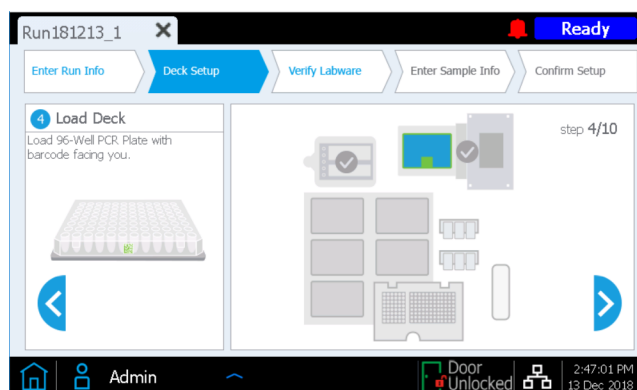
- 2 Magnis Empty Consumables パッケージから Magnis Deep-Well HSM Plate を取り出します。バーコードを手前に向けて、タッチスクリーンに表示されているデッキ位置にプレートを取り付けます。プレートを装填するには、まずプレートの左端をばね式スロットに挿入し、プラットフォーム上で水平になるまでプレートの右端を押し下げます。水平になったら、ばねの力を借りてプレートを少し右にずらし、プレートがプラットフォーム上のホルダーに完全に配置されたことを確認します。



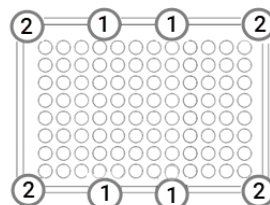
- 3 Magnis Empty Consumables パッケージから Magnis Thermal Cycler Seal を取り出します。黄色いタブから、金属板の下に発泡パッドの保護フィルムを剥がします。保護フィルムをすべて剥がしたら、バーコードを上に向けて、タッチスクリーンに表示されている位置のスロットに Thermal Cycler Seal を挿入します。カチッと音がするまで Thermal Cycler Seal をスロットに差し込みます。



- 4 Magnis Empty Consumables パッケージから Magnis 96-Well PCR Plate を取り出します。プレートのバーコードを手前に向けて、サーマルサイクラーブロックウェルにプレートウェルを挿入することによって、タッチスクリーンに表示されているデッキ位置にプレートを装填します。



プレートをブロックに完全に配置するには、まず下の図で **1** と記されているプレート位置を均等に押して、プレートの中央部をブロックウェルにしっかりと配置します。次にプレートの四隅すべて (下の図で **2** と記されている位置) を均等に押します。



- 5 タッチスクリーンに表示されているそれぞれのデッキ位置に新しいチップボックスを装填します。ボックスから**蓋を取り外します**。蓋を取り外した後、各チップボックスが、そのプラットフォーム位置にある一段高いタブフレーム内に水平に配置されたままであることを確認します。

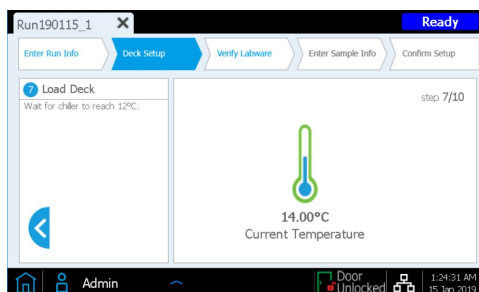


- 6 22 ページで調製した Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate を取り出します。白い厚紙のスリーブを取り外し、バーコードを手前に向けて、タッチスクリーンに表示されているデッキ位置にプレートを装填します。プレートを装填するには、まずプレートの左端をばね式スロットに挿入し、プラットフォーム上で水平になるまでプレートの右端を押し下げます。水平になったら、ばねの力を借りてプレートを少し右にずらし、プレートがプラットフォーム上のホルダーに完全に配置されたことを確認します。

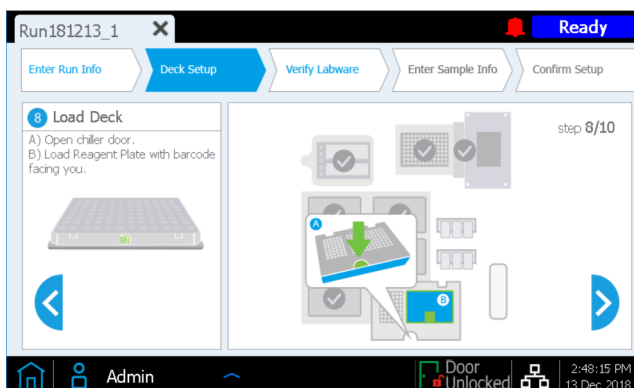


- 7 装置のチラーモジュールは、**手順 8** でラン設定で装填される前に、適切な温度 (通常は 12 °C) に達している必要があります。チラーが装填温度に達するまで、次のようなタッチスクリーン画面が表示され、チラーの状態を確認できます。

チラーが既に必要温度に達している場合、この画面はラン実行の設定中に表示されません。



- 8 次の説明に従って、チラーモジュールを装填します。
- タッチスクリーンに緑色の矢印で示されている半円形のボタンを押して、チラードアを開きます。
 - 23 ページ**で調製した Reagent Plate を準備します。白い厚紙のスリーブを外し、ウェルの底部に気泡がないか確認します。気泡がある場合は、**23 ページ**の説明に従って、プレートを遠心して取り除きます。バーコードを手前に向けて、タッチスクリーンに表示されている位置のチラーモジュールにプレートを装填します。プレート全体に均等に圧力をかけながらしっかりと押し下げます。試薬プレートが冷却プレートホルダーにしっかりと配置されていることを確認します。



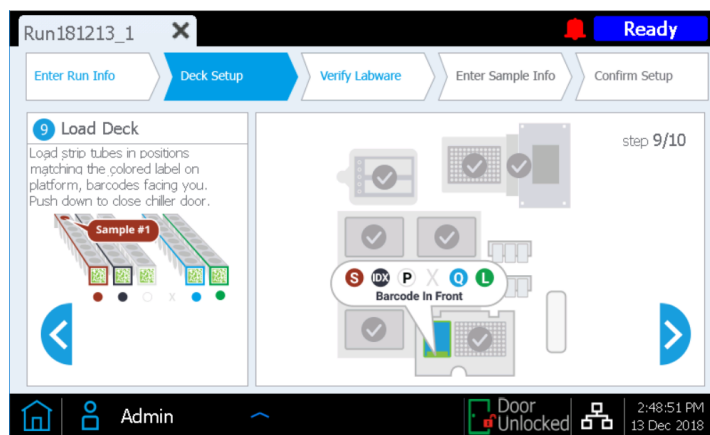
- 9 次の説明に従って、記載される順番で実行用のストリップチューブをチラーの指定位置に装填します。各ストリップを装填する前に、ウェルの底部に気泡がないか確認します。気泡がある場合は、23 ページの説明に従って、ストリップを遠心して取り除きます。装填する際は、ストリップチューブの端をしっかりと均等に押して、それぞれのストリップを適切に配置します。ホイルカバーに触れたり傷を付けたりしないでください。バーコードが手前を向くように各ストリップチューブの向きを合わせます。

- a ランに使用する DNA サンプルが含まれている赤色の sample ストリップチューブ (23 ページで調製し、氷上に置いたもの) を、S というラベルの付いたストリップチューブホルダー位置に装填します。
- b インデックス付きプライマーが含まれている黒色のストリップチューブ (23 ページで調製し、氷上に置いたもの) を、IDX というラベルの付いたストリップチューブホルダー位置に装填します。
- c プローブ溶液が含まれている白色のストリップチューブ (24 ページで調製し、氷上に置いたもの) を、P というラベルの付いたストリップチューブホルダー位置に装填します。
- d Magnis Empty Consumables パッケージから Magnis Library Output Strip、QC Strip、ホイルシールパックを取り出します。空の緑色の library output ストリップ (ストリップの端に「L」と刻印されている) を、L というラベルの付いたストリップチューブホルダー位置に装填します。ホイルカバーはそのままにしておきます。

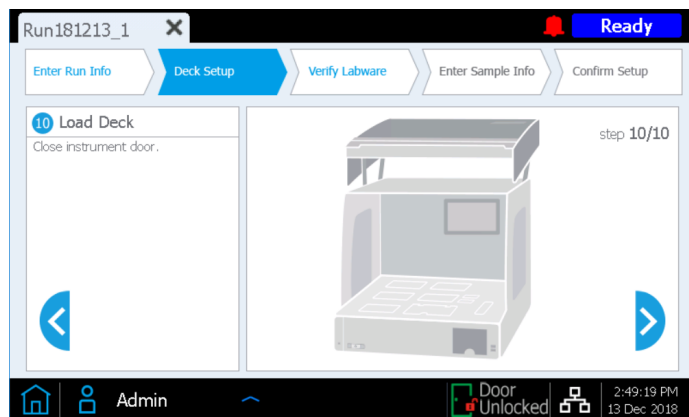
QC 用のプリキャプチャライブラリサンプルの分取がランに含まれる場合は (26 ページをご覧ください)、空の青色の QC ストリップ (ストリップの端に「Q」と刻印されている) を、Q というラベルの付いたストリップチューブホルダー位置に装填します。ホイルカバーはそのままにしておきます。

パッケージに入っている新しいホイルシールを、ラン実行の後に使用できるように用意しておきます。

- e ストリップチューブを S、IDX、P、L、Q (含まれている場合) の位置に装填したら、チラードアを閉じます (カチッと音がするまでドアを完全に閉めます)。



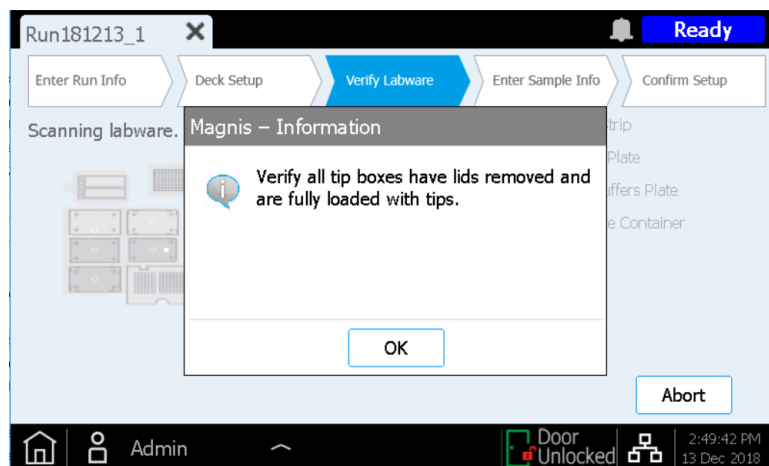
10 装置ドアを閉めます。



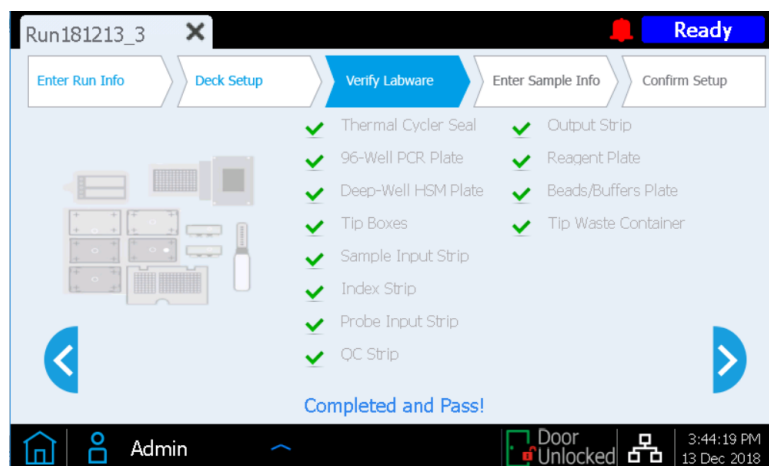
ステップ 3. ラボウェアの確認

Deck Setup の手順がすべて完了すると、ランの Verify Labware (ラボウェアの確認) ステップが装置によって実行されます。この段階では、デッキ上にある各ラボウェアコンポーネントのバーコードがスキャンされます。

自動ラボウェア検証を開始する前に、下のプロンプトに表示されているように、すべてのチップボックスから蓋が取り外されていることと、チップボックスがすべて埋まっていることを確認します。チップボックスの状態を確認したら、**OK**を押して、装置の自動ラボウェア検証を開始します。



バーコードスキャン中、ランの内容に必要なすべてのコンポーネントが正しい位置と向きに配置されており、有効期限が切れていないことが装置によって検証されます。検証結果は Magnis のタッチスクリーンに表示されます。右向きの矢印を押して、次に進みます。



Verify Labware 画面で 1 つまたは複数のコンポーネントの問題が報告された場合は、77 ページの「トラブルシューティングガイド」の改善ガイドラインをご覧ください。

最後の *Verify Labware* 画面では、Probe Input Strip の詳細情報を確認できます。

あらかじめ充填されたプローブストリップを使用している場合、プローブ溶液の ID がストリップバーコードによって Magnis ソフトウェアに自動的に伝達され、下の図のようにプローブプロパティが確認用に表示されます。右向きの矢印を押して、次に進みます。

Run181213_2 X Ready

Enter Run Info Deck Setup Verify Labware Enter Sample Info Confirm Setup

Probe Input Strip information:

Part Number 5190-9886

Lot Number 0123456789

Design ID 1234567

Post-Capture PCR Cycles 10

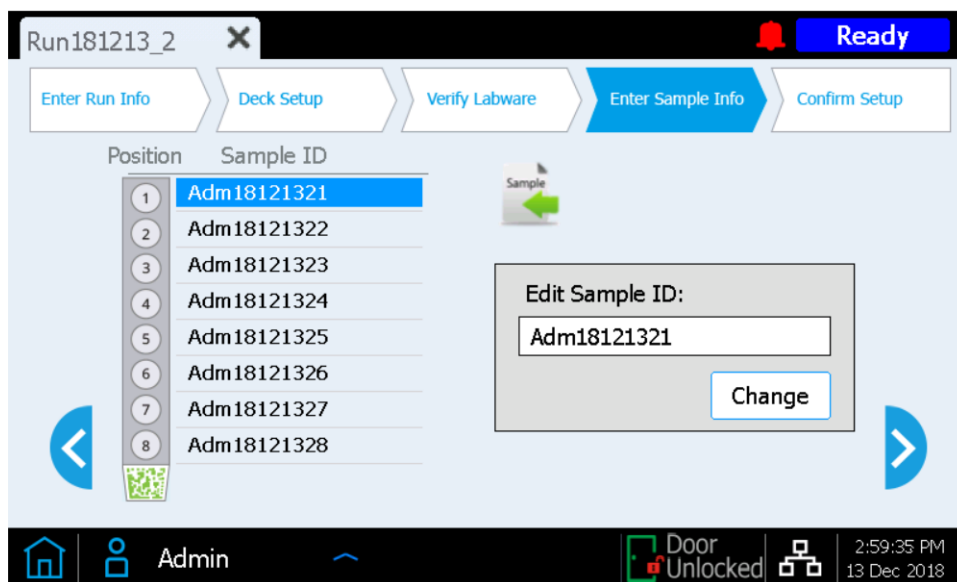
Capture Size Small Large

Door Unlocked 2:58:46 PM 13 Dec 2018

ラン実行時にプローブを充填する probe ストリップを用いる場合 (ラン実行時プローブ調製用の空の probe ストリップが含まれた型番 G9730B のキットを使用する場合)、この画面でプローブ関連プロパティを手動で入力する必要があります。53 ページの手順をご覧ください。すべてのフィールドに入力したら、右向きの矢印を押して次に進みます。

ステップ 4. サンプル情報の入力

この画面を使用して、Magnis ソフトウェア上の各ウェル位置に対応したサンプル ID を入力します。Magnis ソフトウェアによって、各サンプル位置にデフォルトのサンプル ID が自動的に割り当てられます。デフォルトのサンプル ID は、以下の 2 つの方法のいずれかを使用して、選択したサンプル名 / Sample ID に置き換えることができます。



方法 1: .csv ファイルでサンプル割り当て情報をインポートする方法

- 1 17 ページの説明に従って、実行用の Sample ID が正しい順序で含まれている .csv (カンマ区切り値) ファイルを作成し、その .csv ファイルを暗号化されていない USB ディスクにダウンロードします。
- 2 上図の *Enter Sample Info* (サンプル情報の入力) 画面で、サンプルアップロードボタンを押し、プロトコル設定ウィザードのプロンプトに従って USB ディスクからサンプル ID を転送します。



方法 2: 手動でラン設定時にサンプルを割り当てる方法

- 1 タッチスクリーンで特定のサンプル位置を選択します。
- 2 右側の *Edit Sample ID* ツールを使用して目的の Sample ID テキストを入力します。Change を押して、サンプル位置に対して入力した Sample ID テキストを保存します。

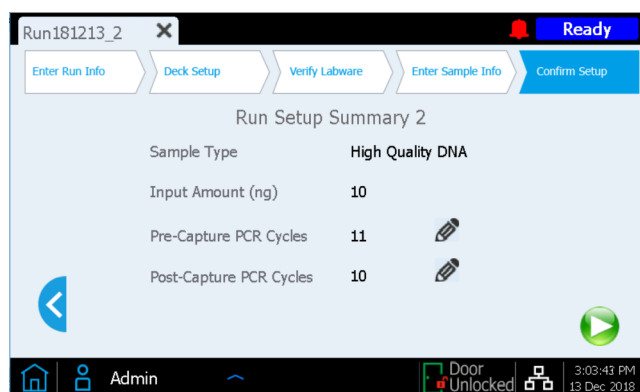
ステップ 5. ラン設定の確認と実行の開始

ラン実行を開始する前に、以下の一連の画面を使用して、ラン実行設定の詳細を確認します。

- 1 最初の画面では、ランの全般的な情報を確認します。各項目が正しいことを確認したら、右向きの矢印を押して最終設定画面に進みます。



- 2 2 番目の画面には、ランに使用される DNA サンプルとプローブの特性に関連するラン実行の詳細情報が表示されます。ランに使用される Pre-Capture PCR Cycles と Post-Capture PCR Cycles の数 (ランに使用するインプット DNA とプローブの一般的な最適条件に基づく) が表示されます。



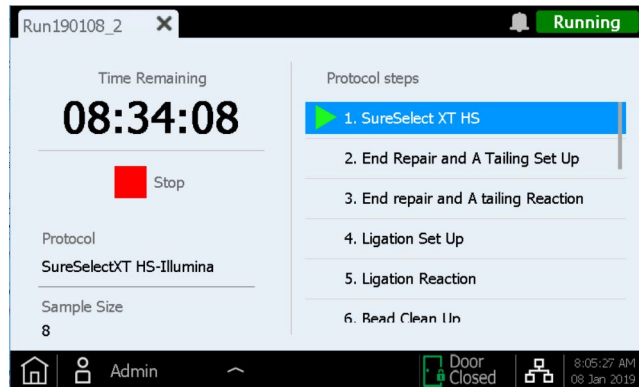
Advanced アクセスレベルのユーザーがログインしている場合は、鉛筆ボタン  を押すことによって、どちらのサイクル数の値も変更できます。*Standard* アクセスレベルのユーザーはこれらの実行パラメータを変更できないため、上図の画面に鉛筆ボタンは表示されません。

- 3 ラン実行設定の詳細を確認したら、開始ボタン  を押してラン実行を開始します。

ラン実行が開始されると、LED インジケータライトが緑色に点灯し、実行完了までの予想残り時間など、ランのステータスがタッチスクリーンに表示されます。

ランは通常 8.5～9 時間かかりますが、便宜上、夜間に実行されることがあります。プロトコルが完了すると、調製済みのライブラリは自動的に 12 °C に維持されます。72 時間以内に装置からライブラリを回収してください。

ラン実行の中止が必要になった場合は、赤色の四角形の **Stop** ボタンを押します。ラン実行の中止を確認する警告メッセージが表示されます。ラン実行を中止した場合、その実行を再開することはできず、その実行で使用されたラボウェアを今後の実行で再び読み込むこともできません。

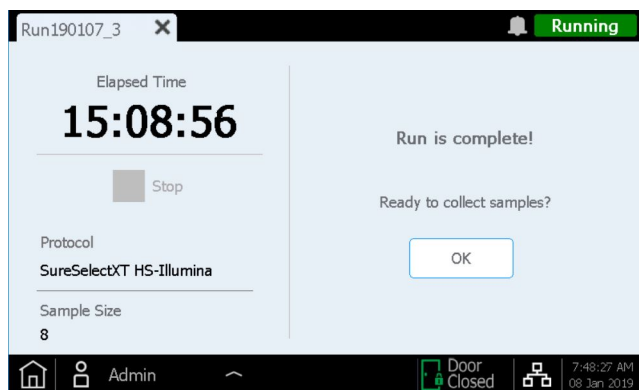


メモ

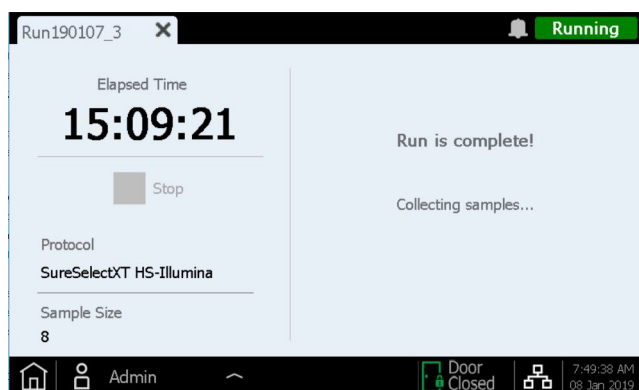
ラン実行中は、*Running* 画面を開いたままにしておく必要があります。画面の閉じる (X) ボタンやその他のナビゲーションボタンは、実行中は使用できなくなります。ラン実行中にタッチスクリーンを使用して他の操作を行うことはできません。

ステップ 6. 装置からの最終的なライブラリサンプルの収集

ラン実行が完了すると、下図のプロンプトがタッチスクリーンに表示されます。装置からライブラリサンプルを収集する準備ができたなら、OKを押します。

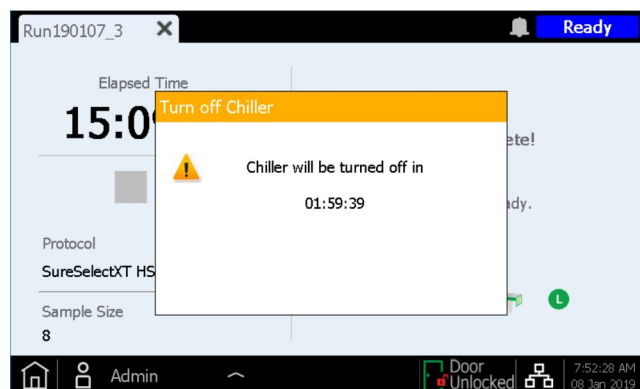


この時点で、調製済みのライブラリ溶液がサーマルサイクラー内の PCR プレートからチラー内の緑色の Library Output ストリップに移動されます。



LED インジケータライトが青色に変わるのを待ちます。これは、装置によるサンプル処理手順がすべて完了したことを示します。その後、装置ドアを開きます。

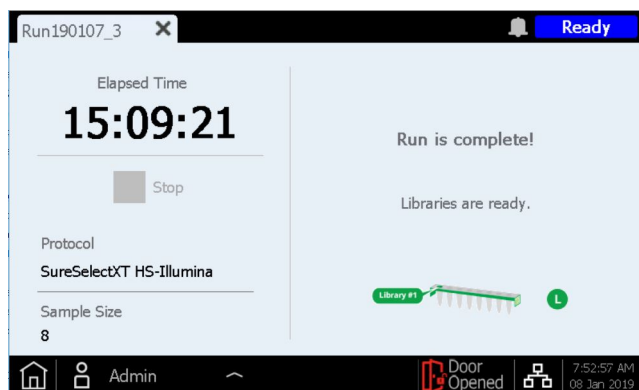
チラー内の緑色の Library Output ストリップにサンプルが配置されると、次のようなタッチスクリーン画面が表示されます。ライブラリサンプルが含まれているチラーは、最大 2 時間にわたり 12 °C に維持されます。冷却保管の残り時間が次のようにタッチスクリーンダイアログに表示されます。装置ドアを開くと、チラーがオフになります。



LED インジケータライトが白色に変わるまで装置ドアを完全に開き、チラーモジュールの L 位置から緑色の Library Output ストリップ内の最終的なライブラリサンプルを収集します。新しいホイルシールストリップ (Library Output と QC ストリップチューブパッケージに付属) を使用してウェルを再度密封し、研究計画に従って適切な保管条件下でライブラリを保管します。

最終的なターゲットエンリッチメント済みのライブラリを DNA シーケンシング用に処理するためのガイドラインについては、54 ページの「[付録3: ラン完了後の NGS 用 DNA サンプル処理のガイドライン](#)」をご覧ください。

ライブラリサンプル収集のためにドアを開くと、タッチスクリーンに次のように表示されます。



タブの X を押して実行画面を閉じ、Home 画面に戻ります。

メモ

画面を閉じるまでに数秒かかる場合があります。X ボタンを何度も押さないでください。

オプションのプリキャプチャライブラリ QC サンプルの処理

ラン実行時にオプションのプリキャプチャライブラリ QC サンプルが収集されていた場合は、チラーモジュールから青色の QC ストリップを取り出します。サンプルが乾燥するまで、開封した QC ストリップを室温に置いて、ウェル内の DNA を乾燥させます。QC サンプルは、シーケンシングライブラリが分析されるまで、乾燥状態で保管できます。

メモ

ラン実行時に 3 µl が分取された後、QC ストリップが開封されたままであるため、ラン実行が終了したときに QC サンプルが乾燥または部分的に乾燥しているように見える場合があります。正確な QC 結果を得るために、サンプルは完全に乾燥させてから保管または再調製してください。

QC サンプルの分析が必要な場合は、乾燥したサンプルを 6 µl のヌクレアーゼフリー水に再懸濁し、Agilent の TapeStation システムおよび D1000 ScreenTape アッセイまたは同様の分析ツールによる分析に適した濃度にします。各ウェルに 6 µl の水を加えた後、室温で 5～10 分間インキュベーションし、ボルテックスによって十分に攪拌して、完全に再懸濁します。

期待される結果： 一般的なプリキャプチャライブラリでの DNA 断片サイズのピークは、高品質のインプット DNA では 300～400 bp、FFPE 由来のインプット DNA では 200～400 bp です。

乾燥させて 6 µl の水に再懸濁した QC サンプルの濃度は、ランに使用した DNA の品質とプリキャプチャ PCR サイクルの数にもよりますが、約 30～100 ng/µl になります。プリキャプチャライブラリの全体的な収量は、再調製された QC サンプル 1 µl 内の DNA 量に 36 を乗算した値です。

ステップ7. ラン終了後の装置の片付け

装置デッキに残っている使用済みの消耗品をすべて取り除いて廃棄します。

- 廃棄ビンドロワーから満杯になった廃棄用容器を取り外し、ドロワーを閉位置に戻します。
- 使用済みの Deep-Well HSM Plate を HSM モジュールから取り外します。
- 使用済みの 96-Well PCR Plate および Thermal Cyclor Seal を PCR モジュールから取り外します。
- すべてのチップボックスを取り外します。いくつかチップが残っているものもあります。
- 使用済みのディープウェル Beads/Buffers Plate を中央デッキプレートホルダーから取り外します。
- チラーモジュールを開き、使用済みの Reagent Plate と使用済みの赤、黒、白のストリップチューブを取り外します。緑色の Library Output (L) ストリップチューブと青色の QC Sample (Q) ストリップチューブがチラーから取り外されており、その後の処理のために保管されていることを確認します。

メモ

新しいランを開始する前に、すべてのラボウェアコンポーネントとその他の残留物を装置デッキから取り除くことが重要です。新しいランを開始したときにデッキに何らかの残留物があると、新しい実行に対して Instrument Health Check エラーが発生することがあります。

装置デッキにこぼれたり漏れたりした物質がある場合は、UV 汚染除去の Extended Cycle 手順を実行することをお勧めします (UV 汚染除去の詳細については、[20 ページ](#)をご覧ください)。装置のユーザーガイドに記載されている指示に従って、漏出物をふき取ってください。

3

付録 1: DNA サンプル調製ガイドライン

- I. Magnis でのラン用の高品質 DNA サンプルの調製 [44](#)
 - ステップ 1. ゲノム DNA サンプルの調製、定量、品質確認 [44](#)
 - ステップ 2. DNA のせん断 [44](#)
- II. Magnis でのラン用の FFPE 由来 DNA サンプルの調製 [47](#)
 - ステップ 1. FFPE サンプルからのゲノム DNA の調製 [47](#)
 - ステップ 2. FFPE DNA サンプルの品質確認と定量 [47](#)
 - ステップ 3. FFPE DNA サンプルのせん断 [49](#)

Magnis SureSelect^{XT HS} DNA シーケンシングライブラリ調製のラン実行を設定する前に、このセクションのガイドラインおよびプロトコルを使用して、DNA サンプルの調製、定量、品質確認、せん断を行う必要があります。

Magnis Sample Input Strip (プレート型で提供されている赤色のストリップチューブ、型番 5190-9882 または 5191-5676) は、ランに使用するすべての DNA の調製試薬および希釈試薬とともに、必ず実験室の PCR 前エリアにのみ保管し、そこでのみ使用してください。

ライブラリ調製プロトコルは、新鮮サンプルまたは新鮮凍結サンプルから調製された高品質 gDNA と、FFPE サンプルから調製された低品質 DNA の両方に対応しています。高品質 gDNA サンプルについては、[44 ページ](#)をご覧ください。FFPE 由来 DNA サンプルについては、[47 ページ](#)をご覧ください。

Magnis でのラン実行には、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng のインプット DNA を含めることができます。シーケンシングで最適な結果を得るには、この範囲内で使用可能な最大量のインプット DNA を使用してください。

I. Magnis でのラン用の高品質 DNA サンプルの調製

Magnis SureSelect XT HS のランには、1X Low TE Buffer で容量 50 µl に調製した 10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng のインプット DNA が必要です。同一ラン内で使用するすべてのサンプルは同量で用意する必要があります。

メモ

せん断する DNA サンプルを水で希釈しないでください。 水に溶解した DNA サンプルをせん断すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が減少します。

ステップ 1. ゲノム DNA サンプルの調製、定量、品質確認

- 1 キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit など適切な精製方法を使用して、製造元のプロトコルに従い、新鮮なまたは凍結したサンプルから高品質の gDNA を調製します。

メモ

ゲノム DNA サンプルの OD 260/280 比が 1.8 ~ 2.0 であり高品質であることを確認してください。

- 2 Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 3 ライブラリ調製用に、適切な量 (10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng) の各 DNA サンプルを、1X Low TE Buffer で 50 µl の最終容量に調製してください。ボルテックスでよく混合し、軽い遠心で液体を底に集めます。サンプルは氷上に置きます。

ステップ 2. DNA のせん断

このステップでは、高品質 DNA に最適化された条件で、50 µl の液量の gDNA サンプルをせん断します。ターゲット DNA 断片サイズは 150 ~ 200 bp です。

メモ

本プロトコルは、Covaris model E220 装置および 130 µl Covaris microTUBE により条件が最適化されています。他の Covaris 装置またはサンプルホルダーを使用する場合は、同じ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 Covaris E220 装置を起動します。操作の詳細は、コバリス社のユーザーガイドをご参照ください。
 - a お使いの装置モデルとサンプルチューブまたはプレートに関する製造元の推奨に従い、最適な高さまで新しい脱イオン水がコバリスのタンクに満たされていることを確認します。
 - 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 装置の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が 5 °C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2 ~ 5 °C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5 °C 以下になっているのを確認します。外部循環冷却装置内の循環冷媒に、冷媒凍結防止剤を使用する場合は、製造元の推奨に従ってください。

- 2 各 gDNA サンプルを、以下の手順でせん断します。
 - a 先がテーパ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。
 - b microTUBE を 30 秒間遠心し、液を底に集め、チューブの底部にある気泡を取り除きます。
 - c microTUBE をコバリスのチューブホルダーにセットし、表 8 の設定で DNA をせん断します。

表 8 Covaris E シリーズ装置のせん断設定 (SonoLab software v7 以降)

設定	値
Duty Factor	10%
Peak Incident Power (PIP)	175
Cycles per Burst	200
Bath Temperature	2 °C ~ 8 °C
Treatment Time	2 × 120 秒 (以下の手順にて 2 段階でせん断を実施してください。) • 120 秒間せん断します • microTUBE を 10 秒間遠心します • microTUBE を高速のボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌します • microTUBE を 10 秒間遠心します • さらに 120 秒間せん断します • microTUBE を 10 秒間遠心します • microTUBE を高速のボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌します • microTUBE を 10 秒間遠心します

- d 次の手順に直接進みます。Covaris microTUBE 内のせん断済み DNA を必要以上に長く放置しないでください。
- 3 せん断済み DNA が含まれている Covaris microTUBE を microTUBE フォルダから取り出し、ローディングステーションの上に載せます。microTUBE の蓋を付けたまま、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。
- 4 全量のせん断済み DNA サンプル (約 50 μ l) を Covaris microTUBE から赤色の Magnis Sample Input Strip の所定のウェルに移します。サンプルを入れる直前に、ピペットチップでストリップチューブのホイルシールを突き刺し穴をあけます。サンプルは氷上に置きます。

必ず正しいサンプルウェル位置にサンプルを入れてください。下の図 7 のように、Barcode (バーコード) から最も離れたところにあるウェルがサンプル 1 になります。

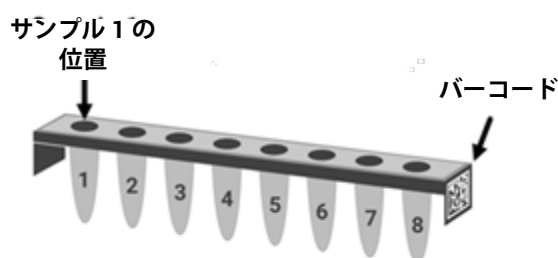


図 7 Magnis Sample Input Strip でのサンプル番号 1 ~ 8 の必要な配置。

- 5 DNA サンプルを移した後、microTUBE を軽く遠心し、残っている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、Magnis Sample Input Strip の同じサンプル番号のウェルに移します。

メモ

このステップでは、特に少量の DNA サンプルを取り扱う時、インプット DNA のロスを避けることが重要です。microTUBE の中を見て、すべてのサンプルを移したことを確認してください。microTUBE に液滴が残っている場合は、[手順 5](#) を繰り返してください。

- 6 すべてのサンプルをチューブに移したら、[23 ページ](#)の sample input ストリップの準備を続けます ([手順 3](#) の項目 d をご覧ください)。

II.Magnis でのラン用の FFPE 由来 DNA サンプルの調製

Magnis SureSelect XT HS のランには、1X Low TE Buffer で容量 50 μ l に調製した 10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng のインプット DNA が必要です。同一ラン内で使用するすべてのサンプルは同量で用意する必要があります。

メモ

せん断する DNA サンプルを水で希釈しないでください。水に溶解した DNA サンプルをせん断すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が減少します。

ステップ 1. FFPE サンプルからのゲノム DNA の調製

FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認

- 1 製造元のプロトコルに従って、キアゲン社の QIAamp DNA FFPE Tissue Kit および Deparaffinization Solution を使用して、製造元が提供するプロトコルに従い、FFPE 組織片から gDNA を調製します。最後のステップで、Mini Elute カラムにて、30 μ l の Buffer ATE で 2 回 gDNA を溶出します。最終的な溶出量は約 60 μ l になります。

メモ

Proteinase K での 1 時間の分解反応後に組織の溶解が不十分な場合は、さらに 10 μ l の Proteinase K を加え、ときどき撹拌しながら最大 3 時間まで 56 °C でインキュベーションを続けます。

同日中にライブラリ調製を行う場合は gDNA サンプルを氷上に置き、後日ライブラリ調製を行う場合は -20 °C で保管します。

- 2 以下のいずれかの方法で、各 FFPE DNA サンプルの品質 (DNA 分解度) を評価します。

ステップ 2. FFPE DNA サンプルの品質確認と定量

以下のいずれかの方法で、各 FFPE 由来 DNA サンプルの品質 (DNA 分解度) を評価します。ランに用いる 10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng を決める際の、サンプル中の増幅可能な DNA の適切な定量方法は、このステップで測定された DNA 分解度により異なります。

方法 1: Agilent NGS FFPE QC Kit を使用した品質確認 (推奨方法)

Agilent NGS FFPE QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を決めることができます。各サンプルの $\Delta\Delta$ Cq スコアに基づく インプット量の推奨内容は表 9 をご覧ください。

- a Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- b FFPE gDNA サンプル 1 μ l を Agilent NGS FFPE QC Kit による $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコアの測定用に分注します。キットの使用法の詳細については、キットのユーザーマニュアル (www.agilent.com) をご覧ください。
- c $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコアが ≤ 1 であるサンプルについては、すべて上記手順 a の項目に記載の Qubit 測定による gDNA 濃度を使用して、必要なインプット DNA 量を決定してください。

- d $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアが >1 であるサンプルについては、すべて Agilent NGS FFPE QC Kit より得られる qPCR ベースの濃度を使用して、必要なインプット DNA 量を決定してください。

表 9 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS の DNA インプット量の決定

プロトコルパラメータ	非 FFPE サンプル	FFPE サンプル	
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
ライブラリ調製に用いるインプット DNA	Qubit アッセイに基づく、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の DNA	Qubit アッセイに基づく、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の DNA	qPCR 定量に基づく、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の増幅可能な DNA

* $\Delta\Delta Cq$ スコアが ≤ 1 である FFPE サンプルは、DNA 入力量を調べる場合、FFPE 以外のサンプルと同様に取り扱う必要があります。その場合、qPCR による濃度ではなく、Qubit 測定の DNA 濃度を使用して、10～200 ng の DNA に必要な量を計算してください。

- 3 ライブラリ調製用に、適切な量 (10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng) の各 FFPE DNA サンプルを、1X Low TE Buffer で 50 μ l の最終容量に調製してください。ボルテックスでよく混合し、軽い遠心で液体を底に集めます。サンプルは氷上に置きます。

方法 2: Agilent の Genomic DNA ScreenTape アッセイ から得られる DIN スコアを使用した品質確認

Agilent TapeStation を用いて Genomic DNA ScreenTape Assay を行い、電気泳動パターンから DNA サンプルの分解度を調べます。サンプルの分解度を調べます。このアッセイでは、各サンプルについて DNA Integrity Number (DIN) の値が出力され、低品質 DNA の場合はその値をもとに DNA インプット量を決定します。

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- FFPE gDNA サンプル 1 μ l を分取し、Genomic DNA ScreenTape アッセイを使用して分析します。キットの使用方法的詳細については、[ユーザーマニュアル \(www.agilent.com\)](http://www.agilent.com) をご覧ください。
- Genomic DNA ScreenTape アッセイで得られた DIN スコアをもとに、[表 10](#) を参照して、サンプルのインプット DNA の推奨量を確認してください。

表 10 DNA Integrity Number (DIN) スコアに基づく SureSelect XT HS の DNA インプット量の決定

プロトコルパラメータ	非 FFPE サンプル	FFPE サンプル		
		DIN $>8^*$	DIN 3～8	DIN <3
ライブラリ調製に用いるインプット DNA	Qubit アッセイに基づく、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の DNA	Qubit アッセイに基づく、10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の DNA	50 ng、100 ng、または 200 ng の DNA を使用します (200 ng までで、可能な限り最大の DNA を使用してください)。Qubit アッセイで定量して、50 ng、100 ng、または 200 ng のインプットに必要な量を決定してください。	100 ng または 200 ng の DNA を使用します (200 ng までで、可能な限り最大の DNA を使用してください)。Qubit アッセイで定量して、100 ng または 200 ng のインプットに必要な量を決定してください。

* DIN >8 である FFPE サンプルは、非 FFPE サンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。

- 4 ライブラリ調製用に、適切な量 (10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng) の各 FFPE DNA サンプルを、1X Low TE Buffer で 50 μ l の最終容量に調製してください。ボルテックスでよく混合し、軽い遠心で液体を底に集めます。サンプルは氷上に置きます。

ステップ 3. FFPE DNA サンプルのせん断

このステップでは、FFPE 由来 DNA に最適化された条件で、50 μ l の液量の gDNA サンプルをせん断します。ターゲット DNA 断片サイズは 150 ~ 200 bp です。

メモ

本プロトコルは、Covaris model E220 装置および 130 μ l Covaris microTUBE により条件が最適化されています。他の Covaris 装置またはサンプルホルダーを使用する場合は、同じ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 Covaris E220 装置を起動します。操作の詳細は、コバリス社のユーザーガイドをご参照ください。
 - a お使いの装置モデルとサンプルチューブまたはプレートに関する製造元の推奨に従い、最適な高さまで新しい脱イオン水がコバリスのタンクに満たされていることを確認します。
 - 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 装置の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が 5 $^{\circ}$ C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2 ~ 5 $^{\circ}$ C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5 $^{\circ}$ C 以下になっているのを確認します。外部循環冷却装置内の循環冷媒に、冷媒凍結防止剤を使用する場合は、製造元の推奨に従ってください。
- 2 50 μ l の各 gDNA サンプル (1X Low TE Buffer で 50 μ l に調製された 10 ng、50 ng、100 ng、または 200 ng の gDNA) を、以下の手順でせん断します。
 - a 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。
 - b microTUBE を 30 秒間遠心し、液を底に集め、チューブの底部にある気泡を取り除きます。
 - c microTUBE をコバリスのチューブホルダーにセットし、表 11 の設定で DNA をせん断します。

表 11 Covaris E シリーズ装置のせん断設定 (SonoLab software v7 以降)

設定	値
Duty Factor	10%
Peak Incident Power (PIP)	175
Cycles per Burst	200
Bath Temperature	2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C
Treatment Time	240 秒

- d 次の手順に直接進みます。Covaris microTUBE 内のせん断済み DNA を必要以上に長く放置しないでください。

- 3 せん断済み DNA が含まれている Covaris microTUBE を microTUBE フォルダから取り出し、ローディングステーションの上に載せます。microTUBE の蓋を付けたまま、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。
- 4 全量のせん断済み DNA サンプル (約 50 μ l) を Covaris microTUBE から赤色の Magnis Sample Input Strip の所定のウェルに移します。サンプルを入れる直前に、ピペットチップでストリップチューブのホイルシールを突き刺し穴をあけます。サンプルは氷上に置きます。

必ず正しいサンプルウェル位置にサンプルを充填してください。下の図 8 のように、Barcode (バーコード) から最も離れたところにあるウェルがサンプル 1 になります。

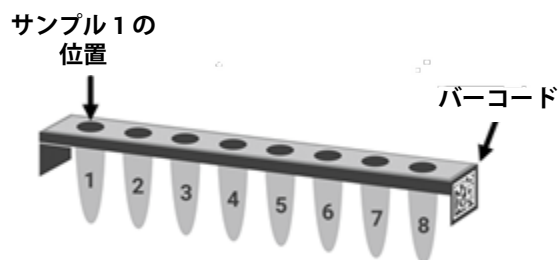


図 8 Magnis Sample Input Strip でのサンプル番号 1～8 の必要な配置。

- 5 DNA サンプルを移した後、microTUBE を軽く遠心し、残っている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、Magnis Sample Input Strip の同じサンプル番号のウェルに移します。

メモ

このステップでは、特に少量の DNA サンプルを取り扱う時、インプット DNA のロスを避けることが重要です。microTUBE の中を見て、すべてのサンプルを移したことを確認してください。microTUBE に液滴が残っている場合は、[手順 5](#) を繰り返してください。

- 6 すべてのサンプルをチューブに移したら、[23 ページ](#)の sample input ストリップの準備を続けます ([手順 3](#) の項目 d をご覧ください)。

4

付録 2: ラン実行時にプローブを分注する probe ストリップの使用

ラン実行時に probe ストリップにプローブを分注する手順 [52](#)

ラン実行設定時の Magnis ソフトウェア上での Probe (プローブ) 情報入力 [53](#)

このセクションは、空の Probe Input Strips が付属する試薬キット (型番 G9730B、元の仕様の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit) を使用するときにご覧ください。このキットを使用したラン実行には、probe ストリップのラン実行時調製と、このセクションで説明する追加データの入力手順が必要です。

このセクションの手順は、充填済みの probe ストリップが付属するキットでは使用しません。充填済みの probe ストリップの準備手順については、[24 ページ](#) をご覧ください。

メモ

Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits に付属する、ラン実行時に充填する probe ストリップを使用するラン実行は、現在サポートされていません。Magnis Reagent Kit と、利用可能なプロトコルの最新情報については、[Agilent.com](https://www.agilent.com) をご覧ください。

ラン実行時に probe ストリップにプローブを分注する手順

空の Magnis Probe Input Strip (型番 5190-9883、プレート型の白色のストリップ) は、実験室の PCR 前エリアで保管し、そこで充填する必要があります。

空の Magnis Probe Input Strip の 8 つのウェルには、同じまたは異なるプローブ溶液を充填できます。ただし、同じ条件 (ハイブリダイゼーションに用いるプローブ量やキャプチャ後 PCR サイクル数の条件) で Magnis のランが実行されるため、同じランで使用するすべてのプローブが同様のデザインサイズである必要があります。

- 1 キット (型番 5190-9883) に付属している、室温保存の空の白色の Magnis Probe Input Strip を 1 つと、新しいホイルシールストリップ (裏紙付き) を 1 つ取り出します。
- 2 ランで使用する適切な SureSelect Probe のバイアルを解凍して混合し、氷上に置きます。
- 3 1 ウェルあたりに必要な SureSelect Probe の量は下の [表 12](#) を参照してください。指定された量の SureSelect Probe 溶液を白色の Magnis Probe Input Strip の各ウェルにピペットに分注します。プローブ溶液を分注する直前に、ピペットチップでストリップチューブのホイルシールを突き刺して穴をあけます。

表 12 空の Magnis Probe Input Strip に入れるプローブの必要容量

試薬キット名 (型番)	[Enter Run Info] 画面で選択するプロトコル	プローブのサイズ	1 ウェルあたりの 分注量	8 サンプルの ランに必要な量
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (G9730B)	SureSelectXT HS-Illumina	≥3 Mb (Large Capture Size)	8 µl	64 µl
		<3 Mb (Small Capture Size)	6 µl	48 µl

メモ

ランで使用するプローブの **Large** および **Small Capture Size** の指定により、ハイブリダイゼーション反応に使用されるプローブ溶液の量が決まります。[53 ページ](#)に記載されている内容で、Magnis ソフトウェア上でこの情報を入力します。

- 4 プローブ溶液をすべてのウェルに分注した後、キットに付属の新しいホイルシールでウェルを再度密封します。probe ストリップのバーコードがホイルシールで隠れないように注意してください。シールがしっかりと均一に貼られていることを確認し、装置に装填する際に、ストリップチューブの配置を妨げる可能性のある過度の突出や折り目がないことを確認します。
- 5 probe ストリップウェルに気泡がないことを目視で確認します。250 × g に設定した遠心分離機で、5 秒間またはプローブ溶液から気泡がすべて放出されるまで、調製した probe ストリップを遠心し気泡を取り除きます。
- 6 [33 ページ](#)でデッキの設定に使用するまで、プローブストリップを氷の上に置いておきます。
デッキの設定時にプローブストリップを装填する際には、ストリップがチラーモジュールに適切に配置されていることを確認してください。

ラン実行設定時の Magnis ソフトウェア上での Probe (プローブ) 情報入力

ラン実行時にプローブを分注するキット (キット型番 G9730B) を使用する場合、ラン実行の設定の際に *Verify Labware* 段階で、下図のフィールドにプローブ関連の情報を入力する必要があります (36 ページをご覧ください)。

ご施設の記録保管要件に沿って、*Part Number*、*Lot Number*、*Design ID* の各フィールドに情報を入力してください。Agilent から提供される *SureSelect* または *ClearSeq* プローブの *Design ID* および *Lot Number* は、製品バイアルおよび分析証明書に記載されています。

プローブデザインのサイズに応じて、PCR サイクル数を *Post-Capture PCR Cycles* フィールドに入力し、ランに使用されるプローブの適切な *Capture Size* を選択します。ガイドラインについては、下の表 13 をご覧ください。推奨 PCR サイクル数は、表に示されているプローブデザインサイズで最適化されていますが、実験デザインの要件に応じて調整していただけます。Magnis Probe Input Strip の 8 つのウェルには異なるプローブ溶液が分注されている場合がありますが、同じランで使用するすべてのプローブに、*Post-Capture PCR Cycles* と *Capture Size* を同じ内容で設定を使用する必要があります。

表 13 実行時に分注するプローブの推奨設定

SureSelect XT HS Probe のサイズ	Post-Capture PCR Cycles	Capture Size
<200 kb	14	Small
200-749 kb	13	Small
750-2999 kb	12	Small
3-5 Mb	10	Large
>5 Mb	9	Large

すべてのフィールドに入力したら、右向きの矢印を押して *Enter Sample Info* 画面に進み、37 ページからのラン実行設定ステップに進みます。

5

付録 3: ラン完了後の NGS 用 DNA サンプル処理のガイドライン

ステップ 1. ライブラリ DNA サンプルの定量とサイズ確認 55

ステップ 2. マルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール (オプション) 57

ステップ 3. シーケンシングサンプルの調製 58

ステップ 4. シーケンシングの開始とデータ解析 60

HiSeq/NextSeq/NovaSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイド
ライン 60

MiSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン 62

データ解析リソース 65

Magnis SureSelect^{XT HS} ライブラリ調製のランが完了した後は、DNA サンプルの定量と品質確認を行い、NGS による分析を行います。このセクションでは、ランが完了した後、NGS 用にサンプルを処理する一般的なガイドラインについて説明します。

ステップ 1. ライブラリ DNA サンプルの定量とサイズ確認

マルチプレックスシーケンシング用にサンプルをプールする前に、Agilent 4200 TapeStation または 4150 TapeStation と High Sensitivity D1000 ScreenTape および関連試薬キットを使用して、調製されたライブラリ DNA サンプルを定量し、サイズを確認します。製品情報については、13 ページの表 3 をご覧ください。詳細な手順については、『[Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide](#)』をご覧ください。

メモ

あるいは、Agilent 2100 Bioanalyzer および [Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay](#)、または Agilent 5200 Fragment Analyzer および [HS NGS Fragment Kit](#) を使用することもできます。詳細な手順については、リンク先のアッセイユーザーガイドをご覧ください。

- 1 『[Assay Quick Guide](#)』の内容に従い、新しいチューブストリップに TapeStation のサンプルを調製します。DNA サンプル 2 μ l を High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2 μ l で希釈します。

注意

精密な濃度測定のため、『[Assay Quick Guide](#)』の手順に従って DNA とサンプルバッファを混合後、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

- 2 『[Assay Quick Guide](#)』の手順に従って、[手順 1](#) で調製した sample plate もしくは tube strip、High Sensitivity D1000 ScreenTape、Loading tip チップを装置にセットします。泳動を開始します。
- 3 泳動終了後のエレクトロフェログラムで、DNA 断片サイズのピークが 200 ~ 400 bp の間にあることを確認します。泳動の例は、[図 9](#) (高品質 DNA から調製されたライブラリ)、[図 10](#) (中程度の品質の FFPE DNA から調製されたライブラリ)、および [図 11](#) (低品質の FFPE DNA から調製されたライブラリ) に示されています。
- 4 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

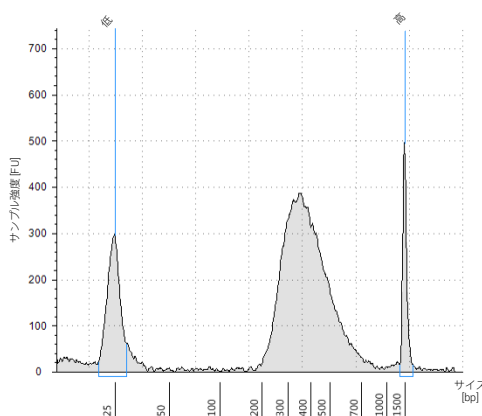


図 9 高品質 gDNA サンプルから調製されたキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイによる解析)

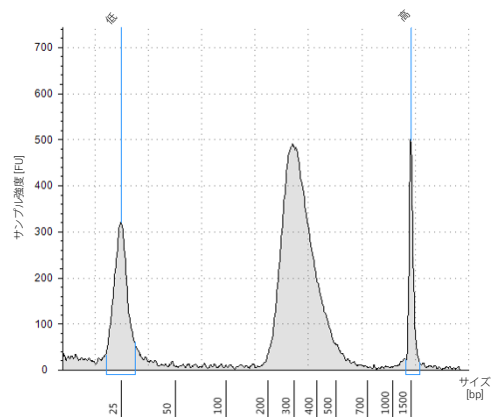


図 10 一般的な FFPE gDNA サンプルから調製されたキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイによる解析)

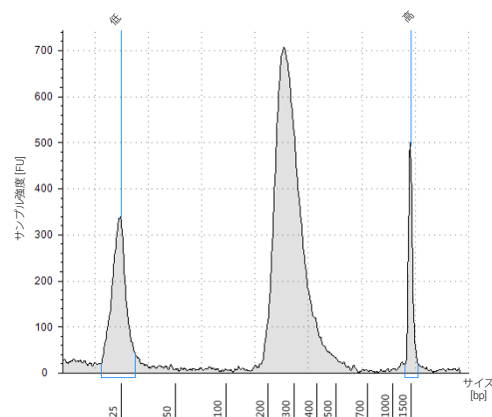


図 11 低品質 FFPE gDNA サンプルから調製されたキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイによる解析)

中断ポイント 次のステップに進まない場合は、サンプルを 4 °C (一晩の場合) または -20 °C (長期間の場合) で保管してください。

ステップ 2. マルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール (オプション)

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、使用するシーケンサの仕様により異なります。1 レーンあたりのマルチプレックス数は、使用するシーケンサのキャパシティや、1 サンプルあたりに必要とするシーケンスデータ量により異なりますので、必ずイルミナ社の提供する最新のプロトコルをあわせて参照してください。

以下のいずれかの手順に従い、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。希釈には、シーケンサ製造元によって指定された希釈液 (low TE など) を使用してください。

方法 1: 同じ最終濃度にプールされる各ライブラリサンプルを希釈します (通常は 4 ~ 15 nM、または最も希釈されたサンプルの濃度)。次に、等体積のすべてのサンプルを混ぜ合わせて、最終的なプールを作成します。

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。

$$\text{インデックスサンプルあたりの容量} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

ここで、 $V(f)$ は、プールされたサンプルの最終的に目標とする容量です。

$C(f)$ は、プールに含まれるすべての DNA の最終的な目標とする濃度です。(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。)

$\#$ は、プールするインデックスの数です。

$C(i)$ は、各インデックスサンプルの初期濃度です。

表 14 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 μ l の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

表 14 10 nM 濃度でトータル 20 μ l に調製する計算例

コンポーネント	$V(f)$	$C(i)$	$C(f)$	$\#$	使用する容量 (μ l)
サンプル 1	20 μ l	20 nM	10 nM	4	2.5
サンプル 2	20 μ l	10 nM	10 nM	4	5
サンプル 3	20 μ l	17 nM	10 nM	4	2.9
サンプル 4	20 μ l	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 を 0.1% v/v になるように加え、-20 $^{\circ}$ C で保存します。短期保存に限ります。もしくは、シーケンサ製造元により指定された条件で保存します。

ステップ 3. シーケンシングサンプルの調製

最終的な SureSelect^{XT} HS ライブラリプールは、イルミナ社の標準的なペアエンドプライマーとケミストリでダイレクトシーケンシングする状態になっています。調製されたライブラリの各断片は、[図 12](#) のように、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のシーケンサを用いてマルチプレックスシーケンシングするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれた状態です。

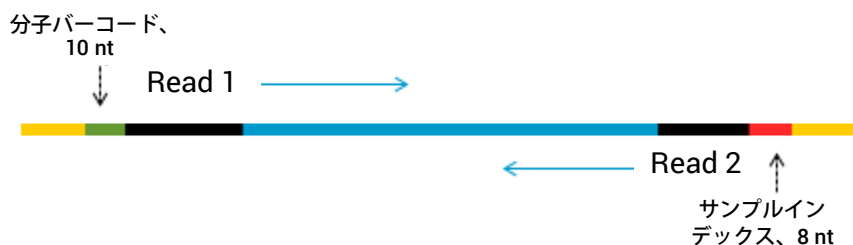


図 12 SureSelect XT HS シーケンシングライブラリの内容。各断片は、1 つのターゲットインサート (青) に、イルミナペアエンドシーケンシングエレメント (黒)、サンプルインデックス (赤)、分子バーコード (緑)、ライブラリブリッジ PCR プライマー (黄) が付加されています。

ライブラリはイルミナ社 HiSeq、MiSeq、NextSeq、NovaSeq プラットフォームでシーケンスすることができます。使用するランタイプとケミストリの組み合わせは[表 15](#)をご覧ください。

注意

解析のパイプラインに分子バーコード (i5) リードを含む場合は、HiSeq2500 の high-output ランモード (v4 chemistry) でシーケンスしないでください。SureSelect^{XT} HS ライブラリを HiSeq2500 プラットフォームでこのモードでシーケンスすると、分子バーコードのシーケンスデータクオリティの低下 (Q スコアの低下、バリエーションコールの範囲と感度への影響) がみられています。HiSeq 2500 プラットフォームの別のランモード/ケミストリの選択については、[表 15](#) をご覧ください。Read 1、Read 2、およびサンプルレベルインデックス (i7) リードのシーケンシングパフォーマンスには影響しませんので、この装置/ランモード/ケミストリを、分子バーコード解析を省略するアプリケーションでは使用できます。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を使用して、クラスター増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は、[表 15](#) に示されています。

SureSelect^{XT} HS ターゲットエンリッチメントライブラリに最適なシーディング濃度は、使用するシーケンシングプラットフォーム、ランタイプ、イルミナ社キットのバージョンにより異なります。ガイドラインについては、[表 15](#) をご覧ください。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およびデータの質に基づき最適化が必要な場合もあります。表に記載されている範囲の中間のシーディング濃度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。

表 15 イルミナ社キットの選択ガイドライン

装置	ランタイプ	リード長	SBS Kit 構成	ケミストリ	シーディング濃度
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2	9 ~ 10 pM
HiSeq 2500	High Output*	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	12 ~ 14 pM
MiSeq	すべてのラン	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2	9 ~ 10 pM
MiSeq	すべてのラン	2 × 75 bp	150 Cycle Kit	v3	12 ~ 16 pM
NextSeq 500/550	すべてのラン	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2 ~ 1.5 pM
HiSeq 3000/4000	すべてのラン	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1	230 ~ 240 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1.0 または v1.5	300 ~ 600 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1.0 または v1.5	200 ~ 400 pM

* 解析のパイプラインに分子バーコード (i5) リードを含む場合は、HiSeq2500 の high-output ランモード (v4 chemistry) でシーケンス しないでください。この条件下で HiSeq 2500 でシーケンスすると、分子バーコードのシーケンスクオリティの低下と Q スコアの低下がみられています。Read 1、Read 2、サンプルレベルインデックス (i7) リードのシーケンシングパフォーマンスは影響を受けません。

ステップ 4. シーケンシングの開始とデータ解析

以下のガイドラインに従い、SureSelect^{XT HS} ライブラリのシーケンシングセットアップと解析を実施してください。

- サンプルレベルインデックス (i7) には、8 bp インデックスリードが必要です。i7 インデックス塩基配列情報については、75 ページの表 34 をご覧ください。
- 分子バーコード (i5) には、10 bp インデックスリードが必要です。
- HiSeq、NextSeq、NovaSeq プラットフォームでは、60 ページのガイドラインに従って、装置のユーザーインターフェイスからランのセットアップを行います。
- MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM) を用いてランのセットアップを行います。62 ページから 65 ページに記載されている手順に従いカスタム sample sheet を作成します。
- 分子バーコード (i5) インデックスリードが含まれる 12 インデックスファイルを取得するには、別途 .bcl ファイルから .fastq ファイルへの変換が必要です。その方法の詳細は、HiSeq、NextSeq、NovaSeq については 61 ページを、MiSeq については 65 ページをご覧ください。
- リードをリファレンスゲノムに対してアラインメントする前に、リードからイルミナ社アダプター配列を除去する必要があります。Agilent の SureCall ソフトウェアでその作業を行なうことができます。その情報については 65 ページをご覧ください。

HiSeq/NextSeq/NovaSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン

装置のコントロールソフトウェアの画面からシーケンスのランセットアップを行います。以下は HiSeq プラットフォームでの 100 + 100 bp ペアエンドシーケンシングのランセットアップの例です。

The screenshot shows the 'RUN CONFIGURATION' tab in the HiSeq control software. The 'Recipe' button is highlighted in the top navigation bar. The main area contains the instruction 'Check remaining parameters and select NEXT to continue.' Below this, there are two sections: 'Index Type' and 'Flow Cell Format'. In the 'Index Type' section, 'Custom' is selected under 'Dual Index'. In the 'Flow Cell Format' section, 'Paired End' is selected. Below these sections, a table-like structure shows the configuration for four lanes: Read 1, Index 1 (i7), Index 2 (i5), and Read 2. The 'Cycles' for Read 1 and Read 2 are both set to 100. The 'Index 1 (i7)' and 'Index 2 (i5)' fields are highlighted with a red box, indicating the paired-end setup.

Read 1	Index 1 (i7)	Index 2 (i5)	Read 2
Cycles: 100	8	10	100

NextSeq または NovaSeq 装置を使用している場合は、Run Setup 画面で同じパラメータを見つけ、上の HiSeq 装置の例に示されている **Cycles** 設定を使用して **Read Length** フィールドに値を入力します。NextSeq または NovaSeq プラットフォームの Run Setup 画面の **Custom Primers** の項目では、すべての primer (Read 1、Read 2、Index 1、Index 2) のチェックボックスを外します (選択しないでください)。

現在 BaseSpace では分子バーコードをインデックスリードとしてシーケンスすることをサポートしておりません。スタンドアローンモードで NextSeq のランを設定してください。

分子バーコードを含む I2 FASTQ ファイルの取得

分子バーコード (i5) インデックスリードを含む I2 インデックスファイルを取得するには、以下の2つの方法のいずれかにより、別途 .bcl ファイルを .fastq ファイルに変換する必要があります。

オプション 1: bcl2fastq ソフトウェアで base masking とともに行う方法

bcl2fastq ソフトウェアを用いて P5 分子バーコードを含む Index 2 fastq ファイルを作成するには、以下の変更を加えイルミナ社の操作説明書に従って実施してください。

- 1 sample sheet を使うことが必須です (オプションではありません)。I5_Index_ID と index2 列の内容は消去して、サンプルインデックスの情報のみを追加し、分子バーコードの情報は含まないように sample sheet を変更します。
- 2 **mask-short-adapter-reads** の数値を 0 に設定します。
- 3 以下の base mask を使用します Y*, I8、Y10、Y* (ここで * は実際のリード長、つまり RunInfo.xml ファイル内のリード長と同じ値を入力します)

注意

イルミナ社の bcl2fastq ソフトウェアを用いて fastq ファイルを作成するとき、必ず上記に示したように sample sheet の index2 列の内容を消去してください。分子バーコードとして N₁₀ の文字を入力するのではなく、カラムのセルを空白にしてください。

bcl2fastq ソフトウェアでは、sample sheet のインデックス配列中の「N」の文字をワイルドカードとして認識しないため、「N」を使用すると配列中の「N」以外の文字と不一致が生じます。

オプション 2: Broad Institute Picard ツールを使用する方法

Broad Institute Picard ツールを使用して P5 分子バーコードを含む Index 2 fastq ファイルを作成するには、次の手順に従ってください。

- 1 **ExtractIlluminaBarcodes** ツールを用いてバーコードを検索します。コマンドのサンプルセットを以下に示します (使用するコマンドとは設備ごとに異なることがあります)。

```
nohup java -jar picard.jar ExtractIlluminaBarcodes
BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/
OUTPUT_DIR=<barcode_output_dir_name> LANE=1 READ_STRUCTURE=<read_structure>
BARCODE_FILE=<barcode_file> METRICS_FILE=<metric_file_name> NUM_PROCESSORS=<n>
```

- 2 **IlluminaBaseCallsToFastq** ツールを用いて、ステップ 1 の出力の内容をもとに fastq ファイルを作成します。コマンドのサンプルセットを以下に示します (使用するコマンドとは設備ごとに異なることがあります)。

```
nohup java -jar picard.jar IlluminaBaseCallsToFastq
BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/ LANE=1
BARCODES_DIR=<barcode_output_dir_name> READ_STRUCTURE=<read_structure>
FLOWCELL_BARCODE=<FCID> MACHINE_NAME=<machine_name> RUN_BARCODE=<run_number>
ADAPTERS_TO_CHECK=PAIRED_END

NUM_PROCESSORS=<n> READ_NAME_FORMAT=CASAVA_1_8 COMPRESS_OUTPUTS=true
MULTIPLEX_PARAMS=<multiplex_params_file> IGNORE_UNEXPECTED_BARCODES=true
TMP_DIR=<temp_directory_location>
```

MiSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイド ライン

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM) ソフトウェアを用いて カスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT HS インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS システムのインデックス塩基配列につきましては、75 ページの表 34 をご覧ください。

カスタム sample sheet のセットアップ

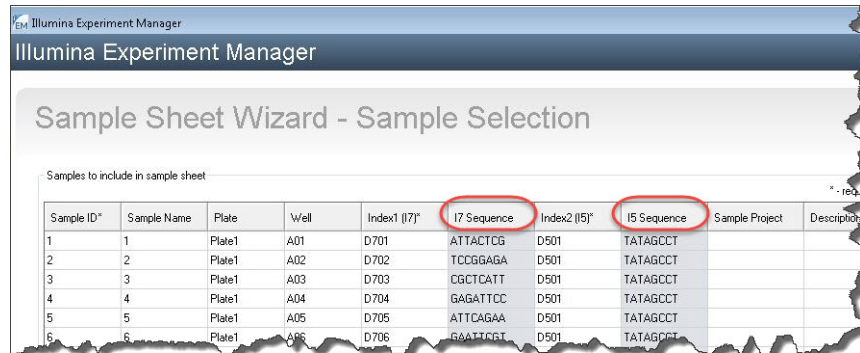
- 1 IEM ソフトウェア中で、以下の Workflow を選択し、MiSeq プラットフォームの sample sheet を作成します。
 - Category から **Other** を選択します。
 - Application から **FASTQ Only** を選択します。
- 2 Workflow Parameters 画面でラン情報を入力し、下の図でハイライトされている主要パラメータが、下図の内容になっていることを確認します。Library Prep Workflow 項目は **TruSeq Nano DNA** を選択します。Index Adapters 項目は **TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)** を選択します。パイプラインでアダプタトリミングに SureCall を使用している場合は、FASTQ Only Workflow-Specific Settings の下にある adaptor-trimming のチェックボックス (下の丸で囲まれた部分) を両方とも外します。これらはデフォルトでは選択されています。

Sample Prep Kit 項目で **TruSeq Nano DNA** を選択できない場合は、代わりに **TruSeq HT** を選択します。

The image shows two panels from the IEM software interface. The left panel, titled 'FASTQ Only Run Settings', contains the following fields and options: 'Reagent Cartridge Barcode*' (MS5871368-300V2), 'Library Prep Workflow' (TruSeq Nano DNA), 'Index Adapters' (TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)), 'Index Reads' (radio buttons for 0 (None), 1 (Single), and 2 (Dual) with 2 (Dual) selected), 'Experiment Name', 'Investigator Name', 'Description', 'Date' (1/22/2018), 'Read Type' (radio buttons for Paired End and Single Read with Paired End selected), 'Cycles Read 1' (100), and 'Cycles Read 2' (100). The right panel, titled 'FASTQ Only Workflow-Specific Settings', contains several checkboxes: 'Custom Primer for Read 1', 'Custom Primer for Index', 'Custom Primer for Read 2', 'Reverse Complement', 'Use Adapter Trimming', and 'Use Adapter Trimming Read 2'. Red boxes highlight the 'Library Prep Workflow', 'Index Adapters', 'Index Reads', 'Read Type', and 'Use Adapter Trimming'/'Use Adapter Trimming Read 2' options.

- 3 **Sample Sheet Wizard** を使用して、**New Plate** を設定し、シーケンシングの対象となる各サンプルの必須情報を入力します。**I7 Sequence** 列では、各サンプルを Illumina i7 インデックスのいずれかに割り当てます。このインデックスは、後のステップで SureSelect XT HS インデックスに変更します。

同様に、**I5 Sequence** 列でも、Illumina i5 インデックスのいずれかを割り当てます。このインデックスは、後のステップで分子バーコードに変更します。



Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Sample Project	Description
1	1	Plate1	A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT		
2	2	Plate1	A02	D702	TCGAGAGA	D501	TATAGCCT		
3	3	Plate1	A03	D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT		
4	4	Plate1	A04	D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT		
5	5	Plate1	A05	D705	ATTGAGAA	D501	TATAGCCT		
6	6	Plate1	A06	D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT		

- 4 sample sheet のセットアップタスクを終了し、sample sheet ファイルを保存します。

SureSelect XT HS インデックスと分子バーコードを含めるための sample sheet の編集

- 1 テキストエディタで sample sheet ファイルを開き、列 5～8 の各サンプルの i7 および i5 インデックス情報を変更します (図 13 でハイライトされている部分)。
 - 列 5 の **I7_Index_ID** には、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS インデックス名を入力します。列 6 の **index** には、対応する SureSelect XT HS インデックス配列を入力します。SureSelect XT HS インデックスの塩基配列については、75 ページの表 34 をご覧ください。
 - 列 7 の **I5_Index_ID** には、すべてのサンプルに対して「MBC」と入力します。列 8 の **index2** の下に、すべてのサンプルについて、各断片をタグ付けする縮重 10 ヌクレオチド分子バーコードを表すテキスト「NNNNNNNNNN」を入力します。

メモ

分子バーコードを含む I2 fastq ファイルを取得するように、MiSeq Reporter ソフトウェアを使用して sample sheet を設定する場合にのみ (65 ページ参照)、**index2** 列に N₁₀ の文字を入力してください。イルミナ社の bcl2fastq ソフトウェアで sample sheet を用いる場合には、N₁₀ のワイルドカードインデックス配列を含めないでください。詳細については、61 ページの「注意」をご覧ください。

[Header]									
IEMFileVersion	5								
Experiment	XTHS								
Date	1/22/2018								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Instrument	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index Adapter	TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)								
Description									
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
100									
100									
[Settings]									
ReverseComplement	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	Index_Plate_Well	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	Sample
XTHS-S1	XTHS-S1	1	A01	A01	A01	GTCTGTCA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS-S1
XTHS-S2	XTHS-S2	1	B01	B01	B01	TGAAGAGA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS-S2

図 13 MiSeq Reporter 用に変更を加えた後の MiSeq プラットフォームで使用する sample sheet

- 2 MiSeq でランを行うために適切なファイルの場所に、編集した sample sheet を保存します。

I2 FASTQ ファイルを取得するための MiSeq Reporter ソフトウェアの設定の変更

デフォルトでは、MiSeq Reporter ソフトウェアはインデックスリードの fastq ファイルを作成しません。MiSeq Reporter を使用して分子バーコードリードを含む fastq I2 インデックスファイルを作成するには、MiSeq プラットフォームを SureSelect XT HS ライブラリのシーケンスに初めて使用する前に、以下の内容に従ってソフトウェア設定を変更してください。一度変更すると、その設定は保持されますので、次のランでは再設定する必要はありません。

この設定を変更するには、**MiSeq Reporter.exe.config** ファイルを開きます。**<appSettings>** タグの下に、**<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>** を追加します。この変更内容を有効にするために、装置を再起動してください。

メモ

SureSelect XT HS ライブラリのシーケンシング以外のアッセイに同じ装置を使用している場合は、他のアッセイを実行する前に configuration file を **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="0"/>** と変更し、装置を再起動する必要があります。

MiSeqDx プラットフォームをご使用の場合は、MiSeq Reporter の設定を変更するために、装置を research モードでご使用ください。もし research モードが使用できない場合は、dual boot configuration に対応したシステムへのアップグレードが必要な可能性があります。

61 ページに記載されている HiSeq、NextSeq、NovaSeq プラットフォームのための I2 fastq ファイル取得の代替方法は、MiSeq プラットフォームにも適用できる場合があります。

データ解析リソース

Agilent SureCall NGS データ解析ソフトウェアは、SureSelect^{XT HS} ライブラリから得られたシーケンスデータのアダプタトリミング、リードアライメント、バリエーションコール解析を行うことができます。SureCall の無償ダウンロードと、SureCall ソフトウェアチュートリアルを含む追加情報については、www.agilent.com の [SureCall ページ](#) にアクセスしてください。

アライメントとダウンストリーム解析に別のパイプラインを使用する場合、Agilent は Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) を提供しています。柔軟なコマンドラインインターフェイスによる、一部の Agilent SureCall 機能は有しており、今お使いのバイオインフォマティクスパイプラインと合わせてお使いいただけます。AGeNT は、high-sensitivity (HS) および HS 以外のデータに対して、アダプタトリミング、低クオリティ塩基のトリミング、duplicate リード除去の機能をもつ、Java ベースのソフトウェアモジュールです。このツールは、施設内の解析パイプラインの構築、統合、保守、トラブルシューティングを担当する施設内バイオインフォマティクスエキスパートを有するユーザー様向けに設計されています。さらに、このモジュールは、AGeNT アルゴリズムの実行とは関係のないすべての問題のトラブルシューティングを行う十分なコンピューティングインフラ環境下と IT サポートを有するユーザー様向けに設計されています。Agilent による AGeNT のサポートは限られていますので、Agilent SureCall ソフトウェアのご使用がお勧めです。Agilent は、AGeNT と組み合わせたアップストリーム/ダウンストリームのサードパーティのデータ解析ツール (オープンソースまたはクローズドソース) は保証しておりません。このツールにつきまして詳細は、www.agilent.com の [AGeNT ページ](#) をご覧ください。

6 リファレンス

Reagent Kit の内容 67

Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit の内容 67

Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (元の仕様) の内容 70

SureSelect XT HS インデックスの参考情報 73

プレート位置情報 73

Index (インデックス) の塩基配列 75

インデックス ID のラン実行後のトラッキング 76

トラブルシューティングガイド 77

この章には、Reagent Kit の内容、インデックスシーケンスインデックス配列、SureSelect^{XT HS}ライブラリ調製のトラブルシューティング情報などのリファレンス情報が記載されています。

Reagent Kit の内容

仕様が変わった Rev B キットと元の仕様のキットを含め、Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits の Agilent 型番を [表 16](#) に示します。ラン実行の設定を開始する前に、必ずキットの仕様タイプを確認してください。仕様が変わった Rev B キットには、対応した RevB プロトコル (ラン実行設定中に [Enter Run Info] 画面で選択) を使用する必要があります。

Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits の内容の詳細については [67 ページ](#) から [69 ページ](#) に、元の仕様の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits については [70 ページ](#) から [72 ページ](#) に記載されています。

表 16 試薬キットの仕様および型番

付属の SureSelect XT HS Probe	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits		Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (元の仕様)	
	96 反応	32 反応	96 反応	32 反応
カスタム 1-499 kb	G9731D	G9731C	G9731B	G9731A
カスタム 0.5-2.9 Mb	G9732D	G9732C	G9732B	G9732A
カスタム 3-5.9 Mb	G9733D	G9733C	G9733B	G9733A
カスタム 6-11.9 Mb	G9734D	G9734C	G9734B	G9734A
カスタム 12-24 Mb	G9735D	G9735C	G9735B	G9735A
Human All Exon V7	G9771D	G9771C	G9771B	G9771A
Human All Exon V8	G9772D	G9772C	販売なし	販売なし
なし (キットにはラン実行時にプローブを分注するための空の Probe Input Strip が付属)	販売なし	販売なし	G9730B	販売なし

Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit の内容

Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit には、[表 17](#) のコンポーネントキットが付属しており、各コンポーネントキットの内容の詳細は [表 18](#) から [表 23](#) に記載されています。

表 17 Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit に付属するコンポーネントキット

コンポーネントキット名	保存条件	コンポーネントキット型番	
		96 反応	32 反応
Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format	-80 °C	型番は 表 18 をご覧ください	型番は 表 18 をご覧ください
Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM	-20 °C	5191-6805	5191-6804
Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	-20 °C	5190-9880	5191-5673
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM	+4 °C	5190-9692	5191-5674
Magnis Empty Consumables	室温	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	室温	5190-9882	5191-5676

表 18 Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format の型番

試薬キット型番	含まれるプローブデザイン	Probe Plate 型番		キットあたりの数量
		2020 年 8 月以降に設計されたプローブ	2020 年 8 月より前に設計されたプローブ	
G9731D (96 反応)	カスタム 1–499 kb (Tier 1)*	5191-6817	5191-6816	1 プレート (12 ストリップ)
G9731C (32 反応)	カスタム 1–499 kb (Tier 1)*	5191-6807	5191-6806	1 プレート (4 ストリップ)
G9732D (96 反応)	カスタム 0.5 –2.9 Mb (Tier 2)*	5191-6819	5191-6818	1 プレート (12 ストリップ)
G9732C (32 反応)	カスタム 0.5 –2.9 Mb (Tier 2)*	5191-6809	5191-6808	1 プレート (4 ストリップ)
G9733D (96 反応)	カスタム 3–5.9 Mb (Tier 3)*	5191-6821	5191-6820	1 プレート (12 ストリップ)
G9733C (32 反応)	カスタム 3–5.9 Mb (Tier 3)*	5191-6811	5191-6810	1 プレート (4 ストリップ)
G9734D (96 反応)	カスタム 6–11.9 Mb (Tier 4)*	5191-6823	5191-6822	1 プレート (12 ストリップ)
G9734C (32 反応)	カスタム 6–11.9 Mb (Tier 4)*	5191-6813	5191-6812	1 プレート (4 ストリップ)
G9735D (96 反応)	カスタム 12–24 Mb (Tier 5)*	5191-6825	5191-6824	1 プレート (12 ストリップ)
G9735C (32 反応)	カスタム 12–24 Mb (Tier 5)*	5191-6815	5191-6814	1 プレート (4 ストリップ)
G9771D (96 反応)	Human All Exon V7	5191-6827	5191-6827	1 プレート (12 ストリップ)
G9771C (32 反応)	Human All Exon V7	5191-6826	5191-6826	1 プレート (4 ストリップ)
G9772D (96 反応)	Human All Exon V8	5191-6974	なし	1 プレート (12 ストリップ)
G9772C (32 反応)	Human All Exon V8	5191-6973	なし	1 プレート (4 ストリップ)

* デザインの Tiers は、2020 年 8 月以降に設計されたプローブのみに適応されます。2020 年 8 月より前にデザインされたカスタムプローブは、従来のプローブ製造プロセスにより製造されており、これらのプローブを付属する製品のラベルにはデザイン Tier は含まれません。

表 19 Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5191-6805 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM	12 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)
5191-6804 (32 反応)		4 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)

表 20 Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9880 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 プレート (12 ストリップ) (1 ランに 1 ストリップを使用)
5191-5673 (32 反応)		1 プレート (4 ストリップ) (1 ランに 1 ストリップを使用)

表 21 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9692 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)
5191-5674 (32 反応)		4 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)

表 22 Magnis Empty Consumables キットのコンポーネント

付属のコンポーネント	数量とフォーマット*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 プレート
Magnis 96-Well PCR Plate	1 プレート
Magnis Library Output Strip	緑色のストリップチューブ、1 個
Magnis QC Strip	青色のストリップチューブ、1 個
Magnis Foil Seals	1 枚 (ストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)
Magnis Thermal Cycler Seal	使い捨ての金属シールプレート、1 枚
Magnis Tip Waste Bin	使い捨ての廃棄物容器、1 個

* 上記は、1 ラン分の Consumables box に含まれているものです。各 96 反応キットには、1 ラン分の消耗品ボックス (型番 5190-9712) が 12 個付属しています。各 32 反応キットには、1 ラン分の消耗品ボックス (型番 5191-5675) が 4 個付属しています。

表 23 Magnis Sample Input Strips キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9882 (96 反応)	Magnis Sample Input Strips	ホイルで密封された空の赤色ストリップ、12 個
	Magnis Foil Seals	2 枚 (1 枚あたりストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)
5191-5676 (32 反応)	Magnis Sample Input Strips	ホイルで密封された空の赤色ストリップ、4 個
	Magnis Foil Seals	1 枚 (1 枚あたりストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)

Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (元の仕様) の内容

Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (元の仕様) には、表 24 のコンポーネントキットが付属しており、各コンポーネントキットの内容の詳細は、表 25 から表 31 に記載されています。

表 24 Magnis SureSelect^{XT} HS Reagent Kit に付属するコンポーネントキット

コンポーネントキット名	保存条件	コンポーネントキット型番	
		96 反応	32 反応
Magnis SureSelect XT HS Probe Plate*	-80 °C*	型番は表 25 をご覧ください	型番は表 25 をご覧ください
Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM	-20 °C	5190-9688	5191-5672
Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	-20 °C	5190-9880	5191-5673
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM	+4 °C	5190-9692	5191-5674
Magnis Empty Consumables	室温	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	室温	5190-9882	5191-5676

* キット型番 G9730B には、Magnis SureSelect XT HS Probe Plate は付属していません。その代わり、G9730B キット（プローブを分注してランを実行するときに使用）には、室温保存の空の Magnis Probe Input Strips (型番 5190-9883) が 12 回のラン実行分付属しています。

表 25 Probe Plate 型番

試薬キット型番	含まれるプローブデザイン	Probe Plate 型番		キットあたりの数量
		初回注文	再注文	
G9731B (96 反応)	1-499 kb	5190-9690	5190-9691	1 プレート (12 ストリップ)
G9731A (32 反応)	1-499 kb	5191-5677	5191-5678	1 プレート (4 ストリップ)
G9732B (96 反応)	0.5-2.9 Mb	5190-9884	5190-9955	1 プレート (12 ストリップ)
G9732A (32 反応)	0.5-2.9 Mb	5191-5679	5191-5680	1 プレート (4 ストリップ)
G9733B (96 反応)	3-5.9 Mb	5190-9886	5190-9956	1 プレート (12 ストリップ)
G9733A (32 反応)	3-5.9 Mb	5191-5681	5191-5682	1 プレート (4 ストリップ)
G9734B (96 反応)	6-11.9 Mb	5190-9888	5190-9957	1 プレート (12 ストリップ)
G9734A (32 反応)	6-11.9 Mb	5191-5683	5191-5684	1 プレート (4 ストリップ)
G9735B (96 反応)	12-24 Mb	5190-9890	5190-9958	1 プレート (12 ストリップ)

表 25 Probe Plate 型番 (続き)

試薬キット型番	含まれるプローブデザイン	Probe Plate 型番		キットあたりの数量
		初回注文	再注文	
G9735A (32 反応)	12-24 Mb	5191-5685	5191-5686	1 プレート (4 ストリップ)
G9771B (96 反応)	Human All Exon V7	5191-5721	5191-5721	1 プレート (12 ストリップ)
G9771A (32 反応)	Human All Exon V7	5191-5720	5191-5720	1 プレート (4 ストリップ)
G9730B (96 反応)	なし (空の Magnis Probe Input Strip を付属)	5190-9883 (空の Probe Input Strip)	5190-9883 (空の Probe Input Strip)	12 ストリップ

表 26 Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9688 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate, ILM	12 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)
5191-5672 (32 反応)		4 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)

表 27 Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9880 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 プレート (12 ストリップ) (1 ランに 1 ストリップを使用)
5191-5673 (32 反応)		1 プレート (4 ストリップ) (1 ランに 1 ストリップを使用)

表 28 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9692 (96 反応)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)
5191-5674 (32 反応)		4 プレート (1 ランに 1 プレートを使用)

表 29 Magnis Empty Consumables キットのコンポーネント

付属のコンポーネント	数量とフォーマット*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 プレート
Magnis 96-Well PCR Plate	1 プレート
Magnis Library Output Strip	緑色のストリップチューブ、1 個
Magnis QC Strip	青色のストリップチューブ、1 個
Magnis Foil Seals	1 枚 (ストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)
Magnis Thermal Cycler Seal	使い捨ての金属シールプレート、1 枚
Magnis Tip Waste Bin	使い捨ての廃棄物容器、1 個

* 上記は、1 ラン分の Consumables box に含まれているものです。各 96 反応キットには、1 ラン分の消耗品ボックス (型番 5190-9712) が 12 個付属しています。各 32 反応キットには、1 ラン分の消耗品ボックス (型番 5191-5675) が 4 個付属しています。

表 30 Magnis Sample Input Strips キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9882 (96 反応)	Magnis Sample Input Strips	ホイルで密封された空の赤色ストリップ、12 個
	Magnis Foil Seals	2 枚 (1 枚あたりストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)
5191-5676 (32 反応)	Magnis Sample Input Strips	ホイルで密封された空の赤色ストリップ、4 個
	Magnis Foil Seals	1 枚 (1 枚あたりストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)

表 31 Magnis Probe Input Strip キットのコンポーネント

型番 (キットサイズ)	付属のコンポーネント	数量とフォーマット
5190-9883 (96 反応)	Magnis Probe Input Strip	ホイルで密封された空の白色ストリップ、12 個
	Magnis Foil Seals	2 枚 (1 枚あたりストリップチューブ用ホイルシールストリップ、6 チューブ分)

SureSelect XT HS インデックスの参考情報

プレート位置情報

Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM には、シーケンシングライブラリにインデックスを付けるためのプライマーが付属しています。プレートサポートに格納されているストリップチューブの各ウェル内には、SureSelect XT HS インデックス A01～H04が含まれています。32 反応キット (型番 5191-5673) に付属のプレートには、A1、A2、A3、A4 というラベルの付いた 4 つのストリップのセットが 1 つ含まれており、それぞれのウェルに A01～H04 というそれぞれ異なる 32 種のインデックスが含まれています。プレートマップについては、表 32 をご覧ください。

表 32 32 反応キットに付属の Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM のインデックスマップ

プレートの カラム	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ストリップ チューブの ラベル	A1	A2	A3	A4								
	A01	A02	A03	A04	—	—	—	—	—	—	—	—
	B01	B02	B03	B04	—	—	—	—	—	—	—	—
	C01	C02	C03	C04	—	—	—	—	—	—	—	—
	D01	D02	D03	D04	—	—	—	—	—	—	—	—
	E01	E02	E03	E04	—	—	—	—	—	—	—	—
	F01	F02	F03	F04	—	—	—	—	—	—	—	—
	G01	G02	G03	G04	—	—	—	—	—	—	—	—
	H01	H02	H03	H04	—	—	—	—	—	—	—	—

96 反応キット (型番 5190-9880) に付属のプレートには、A1、A2、A3、A4 というラベルの付いた 4 つのストリップのセットが 3 つ、合計 12 個のストリップが含まれており、A01～H04 というそれぞれ異なる 32 種のインデックスが 3 ウェルずつ含まれます。プレートマップについては、[表 33](#) をご覧ください。複数のランで調製したライブラリをプールしてマルチプレックスシーケンスする場合は、それらのランで同じ番号のインデックスストリップを使用しないでください。

表 33 96 反応キットに付属の Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM のインデックスマップ

プレートの カラム	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ストリップ チューブの ラベル	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
	A01	A02	A03	A04	A01	A02	A03	A04	A01	A02	A03	A04
	B01	B02	B03	B04	B01	B02	B03	B04	B01	B02	B03	B04
	C01	C02	C03	C04	C01	C02	C03	C04	C01	C02	C03	C04
	D01	D02	D03	D04	D01	D02	D03	D04	D01	D02	D03	D04
	E01	E02	E03	E04	E01	E02	E03	E04	E01	E02	E03	E04
	F01	F02	F03	F04	F01	F02	F03	F04	F01	F02	F03	F04
	G01	G02	G03	G04	G01	G02	G03	G04	G01	G02	G03	G04
	H01	H02	H03	H04	H01	H02	H03	H04	H01	H02	H03	H04

Index (インデックス) の塩基配列

表 34 は、各 SureSelect XT HS インデックスの塩基配列を示しています。各インデックスの長さは 8 塩基であり、シーケンシングの際は 8 bp のインデックスリードが必要です (60 ページをご覧ください)。

表 34 SureSelect XT HS インデックス A01 ~ H04

ストリップ A1		ストリップ A2		ストリップ A3		ストリップ A4	
インデックス	配列	インデックス	配列	インデックス	配列	インデックス	配列
A01	GTCTGTCA	A02	GCGAGTAA	A03	AGCAGGAA	A04	CCGTGAGA
B01	TGAAGAGA	B02	GTCGTAGA	B03	AGCCATGC	B04	GACTAGTA
C01	TTCACGCA	C02	GTGTTCTA	C03	TGGCTTCA	C04	GATAGACA
D01	AACGTGAT	D02	TATCAGCA	D03	CATCAAGT	D04	GCTCGGTA
E01	ACCACTGT	E02	TGGAACAA	E03	CTAAGGTC	E04	GGTGCGAA
F01	ACCTCCAA	F02	TGGTGGTA	F03	AGTGGTCA	F04	AACAACCA
G01	ATTGAGGA	G02	ACTATGCA	G03	AGATCGCA	G04	CGGATTGC
H01	ACACAGAA	H02	CCTAATCC	H03	ATCCTGTA	H04	AGTCACTA

注意

SureSelect XT HS システムのインデックス A01 ~ H04 の配列は、Agilent の SureSelect XT システム A01 ~ H04 の配列とは異なります。

インデックス ID のラン実行後のトラッキング

Magnis Prep System でのランに使用されたインデックスストリップの情報は、タッチスクリーンの Home 画面から **Post-Run Data** にアクセスして確認することができます。**Post-Run Data** 画面から **Labware Info** タブを開き、*Labware* の下の *Index Strip* 行から、ランに使用されたインデックスストリップのプロパティを確認します。インデックスストリップ番号は 1～12 の値で表示されます。画面の右端までスクロールして *Index Strip* 列で確認できます。ランログファイルでも、同様に 1～12 のインデックスストリップ番号を確認することができます。

表 35 は、各インデックスストリップ番号 1～12 に含まれる各 SureSelect XT HS インデックスを示しています。

表 35 Post-Run Data のインデックスストリップ番号からのインデックストラッキング

Post-Run Data 画面またはログの <i>Index Strip</i> 番号	インデックス ストリップ チューブの ラベル (刻印)	ランのサンプル番号に対応したインデックス							
		サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5	サンプル 6	サンプル 7	サンプル 8
1	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
2	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
3	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
4	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
5	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
6	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
7	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
8	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
9	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
10	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
11	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
12	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04

トラブルシューティングガイド

Magnis NGS Prep System での SureSelect XT HS NGS Library Preparation プロトコルの実行、その前のサンプル調製手順、ランの後のライブラリ分析手順について、トラブルシューティングのガイドラインを以下に示します。Magnis 装置の全般的なトラブルシューティングについては、装置のユーザーガイド (資料 K1007-90000) をご覧ください。

タッチスクリーンを使用してラン実行の設定を行う際、操作性に問題がある場合、またはタッチスクリーンが反応しない場合

- ✓ タッチスクリーンのコントロールの代わりに、USB 接続のマウスを使用して Magnis ソフトウェアで選択を行ったりデータを入力したりできます。装置の前面にある 2 つの USB ポートのいずれかを使用してマウスを接続します。接続したら、マウスのポイント & クリック機能を使用して、タッチスクリーンに表示されるインターフェイスで選択を行います。
- ✓ システムを再起動して、タッチスクリーン機能をリセットします。

装置の LED インジケータライトが赤色に変わり、タッチスクリーンに「*Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen.*」というエラーメッセージが表示される場合

- ✓ このエラーメッセージは、Instrument Health Check (IHC) がティーチポイント検証に合格しなかった場合に表示されます。これは、装置デッキのティーチポイントマーカを読み取ることができないか、またはラン実行の設定の前に装置の Auto Teaching 作業を行う必要があることを示しています。装置を使用するには、次の手順を実施します
 - すべての Magnis デッキ位置から、キットの消耗品やその他の残留物が取り除かれていることを確認します。装置デッキに何らかの残留物があると、ティーチポイントマーカが正常に検出されない可能性があります。
 - 装置のユーザーガイドのクリーニング手順に従って、バーコードスキャナの窓をクリーニングします。スキャナにごみや指紋が付いていると、ティーチポイントを読み取れずに検証に失敗する可能性があります。
 - システムを再起動します。ログインすると、もう一度 IHC が実行されます。この IHC で合格すると、Auto Teaching を実施しなくても、ラン実行前の設定手順を再開できます。IHC で合格しなかった場合は、次の手順に従い Auto Teaching を実施します。
 - Home 画面から **Settings** 画面を開き、**Auto Teaching** を押します。タッチスクリーン画面の指示に従ってください。Auto Teaching プロセスには約 30 分かかります。また、作業中に装置にラボウェアを配置するステップがあるため、作業する人が装置のそばに待機している必要があります。
 - Auto Teaching が完了したら、Home 画面から **Run Protocol** を押して、ラン実行前の設定手順を開始できます。

装置の LED インジケータライトが赤色に変わり、タッチスクリーンに Instrument Health Check (IHC) のエラーメッセージが表示される場合

- ✓ IHC でエラーが発生したら、次の手順に従って装置を再起動することをお勧めします。
 - エラーダイアログで **Cancel** を押して、診断テストの開始をキャンセルします。
 - 画面下部のエラーアイコンを押し、エラーコードを記録します。このエラーコードは、Agilent サポートによるトラブルシューティングの際に使用される可能性があります。
 - 装置の前面にある電源ボタンを押して、装置の電源を切ります。
 - すべての Magnis デッキ位置から、キットの消耗品やその他の残留物が取り除かれていることを確認します。装置デッキに何らかの残留物があると、再起動時に IHC で問題が発生する可能性があります。
 - 装置の前面にある電源ボタンを押して、装置の電源を入れます。

- ログインすると、もう一度 IHC が実行されます。この IHC で合格したら、Home 画面で **Run Protocol** を押して、ラン実行の設定手順を開始または再開できます。

装置を再起動しても IHC に失敗する場合は、Agilent テクニカルサポートにお問い合わせください。

[Enter Run Info] 画面の [Protocol] メニューからプロトコルが見つからない場合

- ✓ タッチスクリーンの [Enter Run Info] 画面上の、お使いの装置で実行可能な Magnis のプロトコルは、装置の購入日、プロトコルご提供日、および装置の購入後の更新の有無により異なる場合があります。必要なプロトコルがお使いの装置上にない場合は、[Agilent.com](https://www.agilent.com) の [Magnis プロトコルのダウンロードページ](#) にアクセスして詳細をご覧ください。

チラーモジュール内のストリップチューブの配置が困難な場合

- ✓ チラーモジュール内にストリップチューブを適切に配置するため、充填された sample ストリップ、index ストリップおよび probe ストリップを左から右の順序で装填します。
- ✓ ホイルシールを適切に貼らないと、チラーにチューブを装填する時にストリップチューブの位置決めや配置が妨げられることがあります。sample input ストリップやラン実行時に分注する probe ストリップにホイルシールで再度密封する場合は、過度の突出や折り目のないように、しっかりと均一に密封するようにしてください。

ラボウェアのバーコードをスキャンすると、1 つまたは複数のラボウェアコンポーネントの問題が *Verify Labware* 画面にレポートされる場合

- ✓ すべてまたはほとんどのラボウェアが検証で不合格になった場合は、バーコードスキャナの窓をクリーニングする必要があるかもしれません。クリーニング手順については、装置のユーザーガイドをご覧ください。クリーニングが完了したら、*Verify Labware* の手順を繰り返します。
- ✓ 1 つまたは少数のラボウェアコンポーネントのみが検証で不合格になった場合は、画面の下部にあるエラーアイコンを押して、不合格になった位置の情報を展開して、不合格の理由を確認します。
 - **バーコードスキャナで特定のラボウェアコンポーネントをスキャンできなかった場合**
そのラボウェアが正しいデッキ位置に配置されていること、正しい方向を向いておりバーコードが装置の前面を向いていることを確認します。デッキの装填手順の詳細については、[29 ページ～33 ページ](#)をご覧ください。位置や向きなどの配置エラーを修正してから、*Verify Labware* の手順を繰り返します。不合格になったラボウェアコンポーネントが存在し、正しく配置されている場合は、バーコードに問題がないか目視で確認します。正常にスキャンするには、バーコードに傷、汚れ、結露、ホイルシールによる障害物、プラスチック器具への書き込みやその他のマークがないようにしてください。バーコードの破損や障害物の存在が疑われる場合は、ラボウェアコンポーネントの位置調整または変更を行った後、*Verify Labware* の手順を繰り返します。
 - **スキャンしたラボウェアの有効期限が過ぎている場合**
有効期限が切れているコンポーネントを有効期限が切れていないコンポーネントに交換し、*Verify Labware* の手順を繰り返します。有効期限は、充填済み試薬が含まれている各コンポーネントキットに付属の分析証明書で確認できます。空のプラスチック器具として提供されているコンポーネントには、有効期限がありません。
 - **スキャンした Reagent Plate および Probe Input Strip が不適切なラボウェアとして識別される場合**

特に Reagent Plate および Probe Input Strip が 不適切なラボウェアとして識別される場合、装置に装填された Reagent Kit の仕様に適合した、正しいプロトコルが選択されていることを確認することが重要です。ラン実行用に装填した Reagent Kit の仕様を確認し、下の表を参照して、ラン実行の設定の際に正しいプロトコルが選択されていることを確認します。不適切なプロトコルが選択されている場合は、タッチスクリーンの左向きの矢印を押して [Enter Run Info] 画面に戻り、プロ

トコルメニューを展開してメニューから正しいプロトコルを選択します。正しいプロトコルを選択した後、右向きの矢印キーを押して [*Verify Labware*] 画面に戻り、[*Verify Labware*] 手順を繰り返します。

Reagent Kit	正しいプロトコル
充填済みの probe input ストリップが付属されている Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits	SEL XTHS-RevB-ILM または LT-SSEL XTHS-RevB-ILM
充填済みの probe input ストリップが付属されている 元の仕様の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits	SureSelectXT HS-Illumina
空の probe input ストリップ>(ラン実行時に充填) が付属されている Magnis SureSelect XT HS 元の仕様の Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits	SureSelectXT HS-Illumina

- ラボウェアが不適切なラボウェアとして識別され、選択したプロトコルが正しい場合
置き間違えたラボウェアを正しいラボウェアコンポーネントに交換し、*Verify Labware* の手順を繰り返します。

ピペッタから外れたマイクロピペットのチップが、ランの実行の間に装置デッキの上にある場合

- ✓ 使用済みのチップが装置から廃棄物容器に排出されるときに、チップが跳ね返って装置デッキの上に載ることがあります。ラン実行後、手袋を着用した手で、そのチップを廃棄物容器に移動するか、廃棄します。

ラン実行完了時に装置ドアを開いてライブラリを収集した後、タッチスクリーンの *Turn off Chiller* ダイアログによってランの画面が見えなくなってしまう場合

- ✓ ラン実行の終了時に、LED インジケータライトが青色 (すべての装置ラン手順の完了を示す) に変わる前に装置ドアを開いた場合、または完了時に装置ドアを少しだけ開いた場合、*Turn off Chiller* ダイアログがラン実行画面に表示されたままになり、画面の内容が見えなくなることがあります。今後のランでは、LED インジケータライトが青色 (装置が実行後のアイドル状態になったことを示す) に変わるまで待ってから、装置ドアを開いてください。サンプルを収集する前に、ドアを完全に (LED インジケータライトが白色に変わるまで) 開いてください。

ラン実行の終了時に、ある程度の時間にわたってラン実行完了/サンプル収集の画面に移行せず、タッチスクリーンに *Time Remaining* が 0:00 と表示される場合

- ✓ タッチスクリーンに表示される *Time Remaining* の値は、ラン実行の終了までの残り時間の概算にすぎません。このカウンタは、システムでサンプル収集の準備ができるまでの数分間、0:00 のままになる場合があります。これは、ランの実行または装置の問題を示すものではありません。

電気泳動図での想定よりもライブラリの断片サイズが大きい場合

- ✓ せん断が最適でない可能性があります。高品質 DNA サンプルの場合は、すべての遠心手順とボルテックス手順を 2 段階で実施するプロトコルを使用してせん断が行われていることを確認してください。
- ✓ microTUBE フィラメントに気泡があると、完全なせん断が妨げられることがあります。1 回目のせん断の前に microTUBE を 30 秒間回転させて、気泡が放出されたことを確認してください。

ポストキャプチャライブラリの収量が少ない場合

- ✓ PCR サイクル数の最適化が必要な可能性があります。ポストキャプチャ PCR サイクル数を 1～2 サイクル増やした条件で、再度ライブラリ調製とターゲットエンリッチメントを行います。ポストキャプチャ PCR サイクル数を変更できるのは、*Advanced* アクセスレベルを持つユーザーだけです。詳細については、[38 ページ](#)をご覧ください。
- ✓ ランに使用する DNA サンプルが、「[付録 1: DNA サンプル調製ガイドライン](#)」で指定されている品質および濃度範囲のガイドラインを満たしていることを確認します。
- ✓ 適切なインプット DNA の濃度および品質に対してラン実行が設定されていることを確認します。ランの設定は、実行の **Post Run Data** 画面の **Run Setup** タブで確認できます。
- ✓ せん断された DNA が水ではなく Low TE バッファー環境下であったことを確認します。水に溶解した DNA サンプルをせん断すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が減少します。
- ✓ 30%～70% の湿度条件（結露なし）でランが行われたことを確認します。この範囲外の湿度でシステムを操作すると、パフォーマンスに影響を与え、ライブラリの収量が低下するかゼロになる可能性があります。
- ✓ ランに含まれる 1 つまたは複数のサンプルの収量が非常に少ないかゼロである場合、そのランで使用されたピペットチップに問題があることを示している可能性があります。装置にチップを装填する際に、すべてのチップボックスが埋まっており、プラットフォームの一段高いタブフレーム内に水平に固定されていることを確認してください。チップボックスの蓋を取り外す際に、チップボックスの位置がずれないことを確認してください。

シーケンスリードで目的のゲノム領域が対象にならない場合

- ✓ ターゲットエンリッチメントに不適切なプローブデザインが使用された可能性があります。ランに記録されたサンプルおよびプローブのトラッキング情報を確認してください。必要に応じて、適切なプローブデザインで再度ライブラリ調製を実施します。

本書

このガイドでは、Magnis NGS Prep System を使用して SureSelect^{XT} HS ターゲットエンリッチメント済み Illumina 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自動的に調製する手順について説明します。

