

HaloPlex HS ターゲット エンリッチメントシステム 自動化プロトコル イルミナシーケンシング 対応キット

和文プロトコル

Protocol Version C0 対応 [2016 年 8 月版]

Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.



Agilent Technologies

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、どうしても遅れが生じます。 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、英語版のプロトコル

HaloPlex HS Target Enrichment System Automation Protocol for Illumina Sequencing Version C0, December 2015 G9931-90010

に対応しています。

このプロトコルでは、Agilent HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントシステムを用い、イルミナペ アエンドマルチプレックスシーケンシングプラットフォームに対応したシーケンシングライブラリサ ンプルを調製するための最適化された自動化プロトコルを記述しています。サンプル調製ステッ プは Agilent NGS 自動化システムを使って自動化されています。

このプロトコルは、Agilent NGS 自動化システムを使ってライブラリを調製するためのものです。 Agilent NGS 自動化システムを使わない場合には、別途、専用プロトコルを参照ください。シン グルエンド、マルチプレックスではないペアエンド、メイトペアシーケンス、その他のライブラリには 対応していませんので、ご注意ください。

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

1. はじめに

この章では、実験を始める前に読む必要がある情報(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. Agilent NGS 自動化システムを使用した HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント

この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント のプロトコル概要、および HaloPlex HS の実験をデザインする際の Agilent NGS 自動化シス テムを使った自動化プロセスで注意すべきポイントについて説明しています。

3. サンプル調製

この章では、自動化した HaloPlex HS ワークフローの各ステップについて説明しています。タ ーゲット領域を濃縮した、イルミナプラットフォーム用のシーケンシングライブラリを調製します。

4. リファレンス

この章では、キットの構成試薬やインデックスの塩基配列に関するリファレンス情報について 説明しています。

5. Appendix

FFPE 由来 DNA サンプルを用いるときのプロトコル改変

ここでは、Agilent NGS FFPE QC キットを用いて測定した値に基づくプロトコルのマイナーな 改変について記載します。

アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル

ここでは、デザインによっては観察される可能性のあるアダプターダイマーピークについて、除 去するためのプロトコルを説明しています。

目次

1. はじめに 5

操作に関する注意 6 安全に関する注意 6 実験に必要な試薬 7 実験に必要な装置、消耗品類 9 サンプル QC に使用する装置、消耗品類 10 SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex HS 自動化を行うために追加で必要な部品 10

2. Agilent NGS 自動化システムを使用した HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント 11

Agilent NGS 自動化システムについて 12 HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要 24 自動化ランを行う上での実験条件の検討 26 自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所について 27 装置の設置について 27 実験の所要時間についての情報 27

3. サンプルの調製 29

STEP1. gDNA の制限酵素処理による断片化 30 STEP2. HaloPlex HS プローブと制限酵素消化済み gDNA のハイブリダイゼーション 45 STEP3. ハイブリダイゼーションバッファの除去と環状化ターゲット断片のライゲーション 51 STEP4. ターゲット DNA のキャプチャと洗浄 57 STEP5. キャプチャしたターゲットライブラリの PCR による増幅 62 STEP6. 増幅したターゲットライブラリの精製 67 STEP7. ターゲットエンリッチメントの確認 71 STEP8. マルチプレックスシーケンシングのための異なるインデックスをもつサンプルのプール 76 HiSeq または NextSeq プラットフォーム シーケンシングラン設定ガイドライン 81

4. リファレンス 82

試薬一覧 83 HaloPlex HS Index の塩基配列 86

5. Appendix 88

FFPE 由来 DNA サンプルを用いるときのプロトコル改変 89 アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル 91 HaloPlex Target Enrichment System Protocol



1. はじめに

操作に関する注意 6 安全に関する注意 6 実験に必要な試薬 7 実験に必要な装置、消耗品類 9 サンプル QC に使用する装置、消耗品類 10 SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex HS 自動化を行うた めに追加で必要な部品 10

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE	このプロトコルは、Agilent NGS 自動化システムを使ってライブラリを調製するための ものです。マニュアルでサンプルを調製する場合には、別途、専用プロトコル (G9931-90000 の和訳版)を参照ください。
NOTE	HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントキットを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。
NOTE	本キットにつきましては、他のマニュアル操作の製品と同様に、誤った使用法による
	実験の失敗については、補償の対象外となりますことをご了承ください。万一、自動
	化システムもしくは弊社試薬の不具合により、実験がうまくいかなかった場合は、弊
	社サポート担当にご連絡ください。連絡先はプロトコル末尾に記載されています。
NOTE	本プロトコルは、イルミナ社のマルチプレックスペアエンドライブラリ作製プロトコル
	と異なる点がありますのでご注意ください。
NOTE	ベックマン・コールター社製の精製ビーズについては、必ずベックマン・コールター社
	のユーザーズガイドをあわせて参照ください。



1. はじめに

操作に関する注意

- 本プロトコルは Agilent の HaloPlex HS Target Enrichment System キットに対応しています。
 HaloPlex Target Enrichment System キット、G9906A, G9906B の HaloPlex Exome Target
 Enrichment System キットには対応していません。
- 96 反応キットは、3カラムでのラン(24 サンプル)4回分のマスターミックスを調製する場合には 十分な試薬が含まれていますが、24 サンプル未満のサンプル数で実験していくと、試薬の一部 が96 反応分に足りなくなることがあります。
- 48 反応キットは、3 カラム分のサンプル(24 サンプル)2 回分のマスターミックスを調製する場合には十分な試薬が含まれていますが、24 サンプル未満のサンプル数で実験していくと、試薬の一部が 48 反応分に足りなくなることがあります。
- HaloPlex HS プロトコルでは 50 ng のゲノム DNA (8 組の制限酵素反応用に分注)とピペッティ ングロスを考慮した 8 ng の余剰分で計 58 ng のゲノム DNA からスタートするように最適化され ています。本プロトコルに示されているよりも少ないゲノム DNA 量で実験を行うと、結果に悪影 響を及ぼすことがあります。実験に使用するゲノム DNA の定量には、PicoGreen 染色や Qubit 蛍光測定法などの蛍光色素による DNA 定量法を用いてください。
- ・ 本プロトコル中の stopping point と表示がある箇所では実験を休止し、サンプルを保存することが可能です。サンプルは-20°C で保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
- マスターミックスをサンプルに分注する前に、ピペッティングまたは穏やかなボルテックスで完全
 に混合するようにして下さい。
- Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。
- ・ 銀の Nunc DeepWell プレートインサートに Nunc DeepWell プレートをセットする場合には、プレ ートが浮きやすくなります。手でそっと押し下げて確実にセットするようにしてください。

安全に関する注意

CAUTION

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。

実験に必要な試薬

下記の表は以下のウェブサイトから PDF ファイルをダウンロードしていただくことができます。

http://agilentgenomics.jp

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 1 実験に必要な試薬

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量/1反 応あたり	内容量	備考
HaloPlex HS 試薬キット						
HaloPiex HS カスタムパネル(分子パーコード対応) 以下から選択してください						
HaloPlex HS カスタム 1 kb -500 kb, ブローブ数<20K, イルミナ 、48反応	Agilent	G9931C	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
HaloPiex HS カスタム 1 kb -500 kb, ブローブ数<20K, イルミナ 、96反応	Agilent	G9931B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
HaloPlex HS カスタム 0.501 -2.5 Mb, イルミナ , 48反応	Agilent	G9941C	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
HaloPlex HS カスタム 0.501 -2.5 Mb, イルミナ , 96反応	Agilent	G9941B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
HaloPlex HS カスタム 2.6 -5 Mb, イルミナ , 48反応	Agilent	G9951C	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
HaloPlex HS カスタム 2.6 -5 Mb, イルミナ , 96反応	Agilent	G9951B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 疾患リサーチパネル(分子パーコード対応) 以下から選択してください						
ClearSeq Halo HS Cancerリサーチパネル, イルミナ,16反応	Agilent	G9933A	-	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS Cancerリサーチパネル, イルミナ , 96反応	Agilent	G9933B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS AML リサーチパネル, イルミナ,16反応	Agilent	G9963A	-	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS AML リサーチパネル, イルミナ,16反応	Agilent	G9963B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 心筋症リサーチパネル, イルミナ , 16反応	Agilent	G9943A	_	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 心筋症リサーチパネル, イルミナ , 96反応	Agilent	G9943B	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 遺伝性結合組織病リサーチパネル, イルミナ, 48反応	Agilent	G9954C#008	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 遺伝性結合組織病リサーチパネル, イルミナ, 96反応	Agilent	G9954B#008	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 遺伝性不整脈関連疾患リサーチパネル, イルミナ, 48反応	Agilent	G9954C#005	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS 遺伝性不整脈関連疾患リサーチパネル、イルミナ, 96反応	Agilent	G9954B#005	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS ヌーナン症候群リサーチパネル, イルミナ, 48反応	Agilent	G9954C#009	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS ヌーナン症候群リサーチパネル, イルミナ, 96反応	Agilent	G9954B#009	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS ICGCパネル, イルミナ , 48反応	Agilent	G9954C#006	_	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS ICGCパネル, イルミナ , 96反応	Agilent	G9954B#006	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS X染色体パネル, イルミナ , 48反応	Agilent	G9954C#007	-	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq Halo HS X染色体パネル, イルミナ , 96反応	Agilent	G9954B#007	-	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
* SureDesignでオーダーしたデザインIDと、納品されたライブラリのデザインIDが同じであることを確認してください。						

1. はじめに

Agencourt AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880 または A6 3881	指定	17.6 mL	A63880 5 mL A63881 60 mL	
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies	65602	指定	3.92 mL	10 mL	2 mL (65601)、100 mL(65603) もあります。
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit, Qubit 2.0 fluorometer用	Life Technologies	Q32850 またはQ32 853	指定		Q32850 100 assays Q32853 500 assays	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約8.3 mL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当			98%以上、分子生物学用グレード 他の 有機溶剤のコンタミネーションがないこと
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade				90 mL		
10 M NaOH	Sigma Aldrich	72068-100ML	相当		100 mL	分子生物学実験用グレード
1 M NaOH (用時調製)				1.1 mL		10Mのストック溶液から用時調製
10 mM Tris-HCl (pH 8.5)						分子生物学実験用グレード, 一般的なもので可, pH 8.0でも可

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存ください。

実験に必要な装置、消耗品類

下記の表は以下の WEB-site から pdf ファイルをダウンロードいただくことができます。

http://agilentgenomics.jp

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 2 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品書	指定/ 推奨/ 相当 品	必要量	内容量	備考
Qubit 2.0 fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨			スタート時のgDNAを正確に定量するため に用います。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用 います。
Agilent SureCycler 8800	Agilent	G8800A(本体) G8810A (96 well ブロック)および G8820A (384 wellブロック)	相当			96ウェルタイプのサーマルサイクラー,100 uL以上の容量設定が可能なタイプ、およ び384ウェルタイプのサーマルサイクラー、 指定のプレートEppendorf twin tec full skirted 384 well PCR plateが使用可能な機種。SureCyclerの場 合はプロックを2タイプ用意すれば本体は1 台で可。
Dynal DynaMag-2 または DynaMag-15	Life Technologies	12321D (DynaMag- 2) 12301D (DynaMag- 15)	相当			1回あたりのサンブル数に応じてサイズを 選択。24サンプル/回の場合はDynaMag- 2, 48もしくは96サンプル/回はDynaMag- 15
Robotic Pipetting Tips (250 uL)	Agilent	19477-022	指定			
Eppendorf twin tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	951020401	指定			
Eppendorf twin tec full-skirted 384-well PCR plates, blue	Eppendorf	951020737	指定			区別が容易なように青色タイプを指定して いますが、色違いも使用可能
Eppendorf twin tec half-skirted 96-well plates, blue	Eppendorf	951020362	指定			区別が容易なように青色タイプを指定して いますが、色違いも使用可能
Thermo Scientific Reservoirs	Thermo Scientific	1064156	指定			
Nunc Deep Well Plate, sterile, 1.3 ml well volume	Thermo Scientific	260251	指定			
Axygen 96 Deep Well Plate, 2.0 mL, Square Well (Waste Reservoirs)	Axygen	P-2ML-SQ-C	指定			E&K Scientific p/n EK-2440でも可
Dynal DynaMag-2またはDynal DynaMag-15	Life Technologies (ベリタス)	12321D 12301D	相当			ストレプトアビジンビーズの洗浄に使 用します。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当		250本	マスターミックスの作成やビーズのwashに 使用します。
ピペット	Eppendorf	P10,P20,P200,P100 0	相当			
マルチチャンネルピペット	Eppendorf	0.5 - 10 uL, 10 - 100 uL	相当			制限酵素マスターミックスの作成に使用し ます。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease- Free、エアロゾルブロックフィルター付き						
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly•Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当			
卓上遠心機	WWR	93000-196	相当			1.5 mLチューブ、8連チューブに 対応した卓上遠心機。別々に2台でも可。
卓上プレート遠心機	Labnet Internatilnal	MPS 1000	相当			96ウェルPCRプレートのスピンダウンがで きれば可
アイスバケツ						
タイマー						
ボルテックスミキサー						

* サーマルサイクラーは 96 ウェルタイプで 100 uL以上の容量設定が可能な機種、および 384 ウェルタ イプで、指定のプレート Eppendorf twin tec full skirted 384 well PCR plate が使用可能な機種が必要 です。SureCycler の場合はブロックを2タイプ用意すれば本体は1台で実験可能です。

1. はじめに

サンプル QC に使用する装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品書	指定/ 推奨/ 相当 品	必要量	内容量	備考
オプション1 バイオアナライザによる測定		-			,	-
2100 Bioanalyzer	Agilent		指定			コントロールDNAの制限酵素処理結果の 確認および最終的なライブラリのサイズ・ 濃度の確認に用います。エキスパートソフ トウェアVer B02.07 以降が必要です
High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	10ラン	10ラン分	1ランで最大11サンブルまで流すことがで きます。エキスパートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です
オプション2 TapeStationによる測定						
2200 TapeStation System または4200 TapeStation System	Agilent	G2964AA または G2965AA (2200 TapeStation) G2991AA (4200 TapeStation)	指定			DNAの定性または定量に使用することが できます。
High Sensitibity D1000 ScreenTape キット	Agilent	5067-5584	指定	2ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
High Sensitibity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	2ラン		
Genomic DNA ScreenTape キット	Agilent	5067-5365	指定	フラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	指定	7 ラ ン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガ ロースゲル電気泳動の代わりに使用でき ます。
オプション ゲル電気泳動による測定*						
Xcell SureLock Mini-Cell	Life Technologies	El0001	指定			
Novex 6% Polyacrylamide, TBE Pre-cast Gels	Life Technologies	EC62655BOX	指定	1ラン		
Novex TBE Running Buffer, 5x	Life Technologies	LC6675	指定			
Novex High-density TBE Aample Buffer, 5X	Life Technologies	LC6678	指定			
GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water	Biotium	41001	指定		Ļ	
DNA molecular weight markers				1	ļ	一般的なもので可
UV-transilluminator				1		一般的なもので可

表 3 サンプル QC に使用する装置、消耗品類

*制限酵素消化の確認目的ではゲル電気泳動も利用可能です。最終のライブラリ産物の確認には バイオアナライザまたは TapeStation が必要です。

SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex HS 自動化を行うために追加で必要な部品

NGS 自動化システムの納入時期により、下記の部品が付属していない場合がございます。 下記の部品が付属していない場合は、弊社までお問い合わせ下さい。

表 4 SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex 自動化を行うために追加で必要な部品

品名	製造メーカー	品書	指定/ 推奨/ 相当 品	必要量	内容量	備考
Custom Hardware, 384-well plate inserts	Agilent	G5498B#60	指定	2		2013年7月1日以前出荷のXT- Auto標準システムには含まれず、それ 以降のシステムには2つ含まれています 。
96-well PCR plate insert (red)	Agilent	G5498B#13	指定	2		2013年7月1日以前出荷のXT- Auto標準システムには1つ、それ以降の システムには2つ含まれています。



HaloPlex Target Enrichment System Protocol

2. Agilent NGS 自動化システムを使用した

HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント

 Agilent NGS 自動化システムについて 12

 HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要 24

 自動化ランを行う上での実験条件の検討 26

 自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所について 27

 装置の設置について 27

 実験の所要時間についての情報 27

 この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、HaloPlex HS ターゲットエンリ

この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、HaloPlex HS ターゲットエンリ ッチメントのプロトコルの概要、および Agilent NGS 自動化システムを使った HaloPlex HS 実験の計画を立てる際に考慮すべきことについて説明しています。



Agilent NGS 自動化システムについて

Bravoプラットフォームについて

Bravo プラットフォームは、96 ウェル、384 ウェルのプレートのハンドリングに適した 9 つのプラットフォー ムデッキがある多目的自動分注機です。Bravo プラットフォームは VWorks Automation Control ソフトウ ェアでコントロールします。交換可能な 7 種類の固定チップまたは使い捨てチップ用ピペットヘッドが選択 でき、0.1 µL から 250 µL までの液体を正確に分注できます。

CAUTION

はじめに、ご使用の Bravo プラットフォームの操作、メンテナンス、および安全上の注 意をよくお読みください。Bravo Platform User Guide (G5409-90006) および VWorks Software User Guide (G5415-90063) を参照してください。

Bravoプラットフォームデッキ

このプロトコルの以下のセクションでは、Bravo デッキの指定の場所にプレートや試薬リザーバーを設置 するための説明があります。Bravo プラットフォームデッキの番号については、図 1を参照してください。 正しく自動化システムを使用するために、このデッキの位置情報は非常に重要です。



図 1 Bravo プラットフォームデッキ

電源オン

エアコンプレッサー、Bravo, PlateLoc, Inheco ヒートブロックの電源を入れます。チラーはプロトコルを 参照し、チラー電源をオンにすると指示されているプロトコルでのみ、電源を入れるようにします。エアコ ンプレッサーは電源を入れる前に、排気口をクローズの状態にしていることを確認してください。Bravo の電源は本体右側面にあります。Inheco ヒートブロックの電源は背面に、チラーの電源は左側面にあり ます。PlateLoc は背面の Air スイッチが ON であることを確認します。最後に PC の電源を入れ、 VWorks ソフトウェアを起動します。

電源オフ

VWorks ソフトウェアをクローズします。メソッドは変更したり、上書き保存したりしないようにしてください。その後、Bravo, PlateLoc, Inheco ヒートブロック、チラーの電源を落としていきます。

エアコンプレッサーは電源を落とした後に、排気口を開けて、排気してください。その際、あまり勢いよ く排気口を Open すると、高い圧力で空気と水が飛び出すことがあるので、ご注意ください。動作中に内 部にたまった水も同時に排出されますので、排気口にキムタオルなどを置いて水が床に垂れないように ご注意ください。

PlateLoc は電源を単純にオフすると、プレートを載せるデッキが外に出た状態のままになります。デッ キが出ている状態が気にならない場合はそのままでもかまいませんが、プレートを内部にしまいたい場 合は、エアコンプレッサーの電源をオフにした後、PlateLoc の背面の Air スイッチを OFF にしてください。 デッキを手で、内部に押しこむことができます。次に使用するときには、PlateLoc の背面の Air スイッチを 必ず ON にしてください。

Bravoデッキヒートブロックの温度設定

Bravo デッキ4番と6番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプ ルプレートをインキュベートするために使用しています。低温(4°C)でのインキュベーションステップを含 むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておくと、操作時間を短縮できます。

Bravo デッキヒートブロックの温度は、以下に説明する手順で、Inheco Multi TEC Control 装置で変更することができます。Bravo のヒートブロック付きデッキの番号は、Inheco Multi TEC Control 装置で表 5のように示されます。

表 5	Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示
-----	-------------------------------------

Bravo デッキの位置	Inheco Multi TEC Control Screen の表示
4	CPAC 2 1
6	CPAC 2 2

1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置(CPAC 2 1 または CPAC 2 2)を選択します。



2. 選択したデッキ位置のヒートブロックの温度を設定するには、SET ボタンを押します。



3. テンキーパッドで目的とする温度を入力します。入力した温度は画面の左上に表示されます。正し い温度が表示されたら、その温度表示部分を押すと、その温度が入力されたことになります。(表示 されただけでは入力したことにならないので、ご注意ください。)



4. Tempボタンを押して、新しく設定した温度がSETボタンに表示されることを確認してください。Tempボタンを押すと、Temp.ボタンの色が暗くなり、選択したヒートブロックが新しく設定した温度になるように加熱または冷却されます。このボタンを押さないと、実際に入力した温度にコントロールされないので、ご注意ください。



チラーの温度設定

Bravo デッキの9番にはチラーが接続されており、必要に応じてデッキを冷却または加熱するようになっています。プロトコルにチラーの温度設定の指定がある場合のみ、チラーはONにします。それ以外では 電源をOFF にしておきます。

チラーの温度設定は、画面表示を見ながらUpもしくはDownボタンで、表示温度が指定された温度にな るようにして、ENTERボタンでその温度を決定し、さらにSTARTボタンを押して、指定した温度で温度コ ントロールされるようにしてください。温度コントロールが実行されると、画面表示の左端の*マークが その時点の循環水の温度から上げる場合は+(プラス)マークに、温度を下げる場合は-(マイナス)マ ークに変わります。



VWorks Automation Controlソフトウェア

VWorks ソフトウェアはお使いの Agilent NSG 自動化システムに含まれ、ロボットと周辺機器をパソコン で制御できます。Agilent NGS 自動化システムには、HaloPlex HS システムで必要な自動分注プロトコ ルがすべて入った VWorks ソフトウェアがあらかじめインストールされています。以下に VWorks ソフトウ ェアを使い始める際の一般的な取扱い方法と含まれるプロトコルについて説明します。HaloPlex HS の ワークフローの各ステップで VWorks プロトコルが使用される際には、その都度 VWorks プロトコルで必 要となる設定について説明があります。

NOTE

このマニュアルは、VWorks software version 11.3.0.1195 以降に対応しています。 VWorks のバージョンについてのご質問は、email_japan@agilent.com までご連絡く ださい。

VWorksソフトウェアへのログイン

1. Windows のデスクトップにある HaloPlex_HS.VWForm ショートカットをダブルクリックして VWorks ソフトウェアを起動してください。



- 2. User Authentication ダイアログボックスが現れない場合には、VWorks ウィンドウのツールバーの Log in をクリックしてください。
- 3. User Authentication ダイアログボックスでは、VWorks ユーザー名とパスワードを入力し、**OK** をク リックしてください。(ユーザーアカウントがない場合には、管理者に問い合わせてください。)

C D	Please log in: User name: Password:	OK Cancel

VWorksソフトウェアでの User Authentication の設定(Administrator権限ユーザーのみ可能)

- 1. VWorks ソフトウェアの画面で Full Screen を off にしてください。
- 2. 画面上部のメニューバーから Tools をクリックし、その下の User Management をクリックしてください。
- Create New User を選択します。この画面で、適切な User Name と Password を設定してください。また適切な Security Level を設定ください。Administrator レベルおよび Technician レベルは、メソッドの書き換えが可能なので、Administrator 権限者以外の使用はお勧めしません。通常はメソッドの書き換えができない Operator レベルでの設定を推奨します。ただし、アクセスできる機能は

制限されます。

4. Pass word の適切な有効期間など他の項目を設定し、VWorks の画面に戻ります。

HaloPlex_HS.VWFormを使用したランの設定と開始

HaloPlex_HS.VWForm ショートカットをクリックして VWorks を起動すると、下に示す HaloPlex_HS.VWFormが画面に現れます。この画面上で、各 HaloPlex HS 自動化プロトコルの設定お よび開始を行います。

- 1 デスクトップの HaloPlex_HS.VWForm ショートカットを使ってこのフォームを開きます。
- 2 フォームの左上、**Parameters**の 1) Step と 2) Number of columns of samples のドロップダウンメ ニューから、適切な HaloPlex HS ワークフローステップとサンプルのカラム数を選択します。サンプ ルのカラム数は1つのカラムが 8 サンプルに対応しています。2 カラムは 16 サンプル、3 カラムは 24 サンプルとなり、最大 12 カラムとなります。
- 3 ランのパラメータを決定したら、3) Update layout and information をクリックします。
 - NOTE Update layout and information ボタンをクリックするまでは、表示されたプロトコル を実行することはできません。
- 4 フォームの中央 Bravo Deck Setup の部分には、上で決定したランパラメータに応じて必要となる 試薬と実験器具をセットする Bravo デッキの場所が示されます。セットする場所を間違えると、自動 化プロトコルは正常にランされませんので、本プロトコルを参照してセットした後に、フォーム上の表 示で必ずダブルチェックするようにしてください。



 5 フォーム右上の Current Tip State のチェックボックス(下図)の状態が Bravo デッキ2番のチップ ボックスにある未使用のチップの配置と合っているか確認してください。
 12 カラムのチップが入っている新しいチップボックスの場合、下に示すように Current Tip State の 未使用チップのチェックボックス(上段、Box 2)が全ての位置で選択されている必要があります。



同様に使用済みチップのチェックボックス(下段、Box 8)が Bravo デッキ 8 番のチップボックスにあ る使用済みチップの配置と合っているか確認してください。

空のチップボックスの場合、上に示すように Current Tip State の使用済みチップのチェックボック スが全ての位置で空欄となっている必要があります。

Reset をクリックすると2番のチェックボックスが全て選択され、8番のチェックボックスが全て空欄になります。(上図の状態)

- NOTE ラン開始時に Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番と8番に存在するチッ プの配置と一致していることが重要です。実際のチップの配置とソフトウェア上の設 定が異なると、正しく分注されずに実験が失敗します。また、クラッシュの原因にもな りますので十分に確認してください。 新しいチップ・使用済みのチップともに場所がソフトウェア上で正確に設定されていれ ば、使いかけのチップボックスを HaloPlex HS 自動化プロトコルに使うことができま す。
- 6 NGS 自動化システムが正しくセットアップされていることを確認したら、フォーム左下の **Control** セ クションにある **Start** をクリックしてランを開始します。 VWorks Control Toolbar にある Start ボタン を使わないでください。 ランは下図の HaloPlex_HS.VWForm Form の Start ボタンを使って始める ようにして下さい。



Bravoの初期化

Bravo の電源を入れて最初に VWorks をスタートしたときには、Bravo の初期化の動作に伴い、必ず画面に下記のエラーメッセージが2回出ます。必ず下記の指示に従って、操作ください。この時点で選択を間違えると、初期化が正しく行われず、プロトコルをランしている途中にエラーで止まってしまいます。正しい選択を行うように注意ください。

1. 最初はグリッパーの初期化に伴うG axis のエラー表示が出ます。

このエラー表示が出たら、常時 Ignore and Continue, leaving device in current state を選 択してください。

There appears to be a plate present in, or in front of the gripper's plate presence sensor. - Choose "Retry" to check the plate presence sensor again. - Choose "Ignore" to continue to home the G axis. Please note that any plate currently held by the gripper will be dropped. - Choose "Abort" to cancel initialization.
v
Diagnostics
Retry
Ignore and Continue, leaving device in current state

2. 次に W-axis の初期化に伴うエラー表示が出ます。

Bravo - 1 Error

Please verify that it is safe to home the w-axis, the
aspirate/dispense axis). If there is fluid in the tips you
may want to manually home the W-axis in diagnostics
over a waste position.

• Choose "Atport" to continue homing the W-axis.
• Choose "Ignore" to leave the W-axis unhomed.
• Choose "Abort" to cancel initialization.

Diagnostics

Retry
Ignore and Continue, leaving device in current state
Abort

Add to Error Library
...

このエラー表示が出たら、常時 Retry を選択してください。

シミュレーション設定の確認

VWorks ソフトウェアはシミュレーションモードで実行することもでき、その間に画面に入力したコマンドは NGS 自動化システムでは実行されません。ランを開始しても自動化システムの装置が反応しない場合、 以下の操作を行い、VWorks でのシミュレーションモードの状態を確認してください。

ステータスインジケータに Simulation is off と表示されていることを確認してください。(View > Control Toolbar とクリックするとステータスインジケータが表示されます。)

🚫 Log out 🍋 Compile 🌔 Start 💷 Pause al 🕢 Simulation is off 😥 Diagnostics

- そのインジケータに Simulation is on と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押し てシミュレーションモードをオフにしてください。
- NOTE HaloPlex HS.VWorks フォームにツールバーが見えない場合、Full Screen on/off をクリ ックしてフルスクリーンモードを終了してください。それでもツールバーが見えない場合には、 フォーム上で右クリックし、メニューから Control Toolbar を選択してください。

Ignore All Incubation 設定の確認

フォーム右下の Advanced Settings の中に Ignore all incubation times (testing only)というチェッ クボックスがあります。これは、システムのテストを行う際にインキュベーションの時間をゼロにして、短 時間で終了するための機能です。このチェックが入っていると、インキュベーションが行われないため、 サンプル調製を正常に行うことができません。

実験を行う際には、チェックがはずれていることをご確認ください。

-Advanced Settings

Enable audio alerts

☐ Ignore all incubation times (testing only)

Ignore all incubation times (testing only) にチェックが入っている状態でプロトコルをスタートすると、 下記のメッセージが表示されます。いったん Pause and Diagnose から Abort してプロトコルを終了し ます。Ignore all incubation times (testing only) のチェックをはずし、再度プロトコルをスタートしてく ださい。

Incubation Times	
The ignore all incubation times box is checked. This is for testing only and will skip all timed incubations.	
Click Continue if this is intended. Abort the protocol if the box should not be checked.	
User data entry:	
Pause and Diagnose Continue	

プロトコルの終了

下のウィンドウはランが完了すると表示されます。Yes をクリックして、次の.pro でのランに備えるために 使った試薬などを取り除いてください。ただしプロトコルによっては引き続き使用するプレートやラックもあ りますので、各ステップでの指示に従ってください。

Protocol complete!							
2	Release stacke	r racks used in protocols?					
	Yes	No					

VWorksの終了

Administrator もしくは Technician モードで VWorks を使用している場合は、VWorks を通常の操作で Close できますが、Operator モードで使用している場合、そのまま VWorks を close することができません。下記の手順で Close ください。

1. VWorks の Form の画面に出ている Full Screen on/off をクリックして、Full Screen off の状態にします。



2. 画面上部の Control Toll Bar から Log out のアイコンをクリックします。

Compile Dog Start D Pause a

もし Control Tool Bar が画面に出ていない場合は、画面上部の View のメニューをクリックし、その中の Control Toll Bar を選択した状態にしてください。

3. Log out すると、このボタンが Log in に変わります。下記のユーザー名と password でログインしてく ださい。

User Name	:	administrator
Pass word	:	administrator

4. ログイン後ただちに、VWorksをCloseしてください。ここで万一プロトコルを変更してしまうと、上書き されてしまう怖れがあります。ログイン後は操作をせずに、ただちに Close してください。

HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要

イルミナペアエンドシーケンス対応の HaloPlex HS キットを用いてライブラリを調製する際の操作の概略 を図 2 に示します。シーケンスを行うためのサンプルは、サンプルごとに HaloPlex HS で濃縮され、イン デックスタグが付加されたライブラリが調製されます。使用するシーケンシングプラットフォームに応じて、 1 レーンあたり最大 96 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスが行えます。イルミナのマ ルチプレックスシーケンスでは、1 ランに用いる 1 フローセルのすべてのレーンをマルチプレックスシーケ ンスにする必要があります(ご使用のバージョンによっては、この制限がない場合もあります)。詳細はイ ルミナ社のプロトコルを参照ください。

表 6 には、HaloPlex HS のワークフローの中で使われる VWorks のプロトコルがまとめてあります。サン プルを処理する際に使用される VWorks プロトコルの詳細な説明については、サンプル調製の章を参照 してください。

ワークフローステップ	Agilent NGS 自動化システムで使用される VWorks プロ トコル
ゲノム DNA の制限酵素消化	Digestion_v1.0.pro
HaloPlex HSプローブとサンプルDNAのハイブ	Hybridization_v1.0.pro
リダイゼーション	
環状化ターゲット断片のライゲーション	Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.pro
濃縮したサンプルのキャプチャと洗浄	Capture_&_Wash_v1.0.pro
ライブラリの PCR 増幅	Amplification_v1.0.pro
増幅したライブラリの精製	Final Purification v1.0.pro

表 6 ワークフローで使用される VWorks プロトコルの概要



図 2 サンプル調製ワークフロー

自動化ランを行う上での実験条件の検討

Agilent NGS 自動化システムを用いて、HaloPlex HS で調製できる gDNA サンプルの数は、1、2、3、4、 6、または 12 カラム(8、16、24、32、48、または 96 ウェルに相当)から選択できます。ただし、試薬は 3 カラム(24 サンプル)単位で使用したときに過不足がないように調整されているので、24 より少ないサン プル数でランしたときには、試薬が 48 または 96 サンプル分には足りなくなります。できるだけ 24 サンプ ル単位で自動化ランを行うように実験計画を立ててください。

カラム数	総サンプル数
1	8
2	16
3	24
4	32
6	48
12	96

表 7 カラム数とサンプル数の対応表

各 96 反応分のキットは、1 ランあたり 3 カラム(24 サンプル分)の実験を 4 回行うために必要な試薬量 を含んでいます。

自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所について

 Agilent NGS 自動化システムは、サンプルの処理を常にカラム(Column、縦の列)単位で行い、カ ラム 1 がスタートポイントとなります。よって、gDNA サンプルは 96 ウェルプレートにカラム単位でセ ットし、A1 から H1 へ、次に A2 から H2 へ、最後に A12 から H12 という順番でセットするようにしま す。12 サンプルカラムより少ないカラム数でランを行うときには、サンプルカラム間に間を空けず、 つねに左のカラムから隙間のないように、サンプルをセットするようにします。



ハイブリダイゼーションでのサンプルへのインデックスタグ付加のステップでは、HaloPlex HS インデック スプライマーを別のプレートにセットする必要があります。実験デザインを立てる際に、適切な番号のイ ンデックスプライマーを適切なウェル(サンプル)にそれぞれ割り当てるようにしてください。HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント システムで使用する 96 種類のインデックスの塩基配列については、 Reference の HaloPlex HS Index の塩基配列を参照してください。

装置の設置について

ワークフローのステップの中には、Bravo デッキとサーマルサイクラーとの間でサンプルプレートを迅速 に動かす必要があります。使用するサーマルサイクラーを Agilent NGS 自動化システムのできるだけ 近くに設置し、迅速で効率的なプレート移動ができるようにしてください。

また、ワークフローのステップの中には、サンプルプレートをPlateLoc サーマルマイクロプレートシーラー でシールした後、遠心してスピンダウンするステップがあります。効率をよくするために、遠心機を Agilent NGS 自動化システムの近くに設置するようにしてください。

実験の所要時間についての情報

実験を始める前に、キットに附属する Certificate of Analysis を参照し、使用するデザインについての適切なハイブリダイゼーションの時間(2 時間もしくは 16 時間)を確認してください。ほかのステップについてもプロトコルを確認し、実験開始時間について計画してください。

プローブ数 20000 未満のデザインでは、2 時間のハイブリダイゼーションを行います。最初のステップである制限酵素処理から PCR までを 1 日で行うことができます。

プローブ数 20000 以上のデザインでは、16 時間のハイブリダイゼーションを行います。 HaloPlex_HS.VWForm でサンプル数ごとの所要時間を確認できますので、ハイブリダイゼーションのス テップがオーバーナイトとなるように計算して制限酵素処理を始める時間を決めてください。

DNA サンプルの品質と量に関する情報

HaloPlex HS 実験に使用するゲノム DNA サンプルの品質と量はターゲットエンリッチメントのパフォーマンスに影響します。

実験を始める前に、ゲノム DNA サンプルの OD260/280 の比が 1.8~2.0 の間にあることを確認して下さい。また、ゲル電気泳動で各ゲノム DNA のサイズ分布を確認してください。2.5 kb より小さいサイズのス メアが観察される場合、gDNA サンプルが分解している恐れがあります。

ー般的な DNA サンプル (FFPE 由来でないサンプル)では、スタート DNA 量を正確に定量するために、 PicoGreen 染色や Qubit 蛍光測定法などの、蛍光強度に基づいた方法で定量することが重要です。

標準プロトコルでは、反応に必要な 50 ng とピペッティングによるロスを考慮した余剰分のあわせて 57.6 ng の gDNA を 8 well に分注し、それぞれ異なる制限酵素反応を行います。本プロトコルで 57.6 ng より 少ない gDNA を使用した場合、収量が低下し、頻度の低いアレルが検出されないことがあります。

FFPE サンプルのターゲットエンリッチメント

このプロトコルでは DNA の品質に応じて使用する DNA 量を変更することで、FFPE 由来 DNA サンプル を使用することができます。実験を始める前に 88 ページの Appendix を参照し、適切なスタート DNA 量 (50 ng から 100 ng) と DNA の定量方法(蛍光定量法または qPCR) を選択して下さい。



3. サンプルの調製

STEP1.gDNA の制限酵素処理による断片化 30

STEP2. HaloPlex HS プローブと制限酵素消化済み gDNA のハイブリダイ ゼーション 45

STEP3. ハイブリダイゼーションバッファの除去と環状化ターゲット断片の ライゲーション 51

- STEP4. ターゲット DNA のキャプチャと洗浄 57
- STEP5. キャプチャしたターゲットライブラリの PCR による増幅 62
- STEP6. 増幅したターゲットライブラリの精製 67
- STEP7. ターゲットエンリッチメントの確認 71
- STEP8. マルチプレックスシーケンシングのための異なるインデックスをも つサンプルのプール 76

この章では、Agilent の HaloPlex HS キットを用いてゲノム DNA (gDNA)からターゲットエンリッチメ ントを行い、イルミナプラットフォームでシーケンス解析を行うことができるライブラリを調製する方法 を説明しています。gDNA サンプル 1 つにつき、ターゲット領域が濃縮され、インデックスタグが付加 されたライブラリが 1 つ調製されます。

カスタムデザインの場合、ターゲット領域は 1 kb – 5 Mb の範囲となります。キット購入前にオンラインの SureDesign (http://www.agilent.com/genomics/suredesign)を使い、カスタム HaloPlex HS プローブをデザインする必要があります。

HaloPlex HS ターゲットエンリッチメント システムでは、数千のターゲット DNA が同じ反応液中で増幅され、その過程でイルミナペアエンドシーケンシングに必要なモチーフも取り込まれます。ハイブリダイゼーションとそれに続く過程で、各サンプルに異なるインデックスタグが付加されるので、シーケンシングの1レーンに96サンプルまでプールして解析することが可能です。また、ハイブリダイゼーション時に取り込まれるインデックスプライマーには分子バーコード配列が含まれており、シーケンス解析の際に、個々のターゲットアンプリコンを区別することができます。

HaloPlex HS を用いた操作の概略は図 2 をご覧ください。



3. サンプルの調製

STEP1.gDNAの制限酵素処理による断片化

このステップでは、gDNA サンプルを8種類の異なる制限酵素反応液中(それぞれ2種類の制限酵素を 含む、合計 16種類の制限酵素)で断片化することで、gDNA 制限酵素断片ライブラリを作製します。16 種類の制限酵素は、8連チューブ2本に入った状態でキットに含まれます。2本の8連チューブは緑色 マーカー、赤色マーカーで区別することが可能です。緑チューブ、赤チューブの対応するウェルに含まれ る制限酵素同士を合わせることで、8種類の異なる制限酵素マスターミックスを作成します。その後に各 gDNA サンプルと合わせることで制限酵素反応を行います。50 ng のゲノム DNA とピペットロスを考慮し た余剰分を8種類のダブルダイジェスト反応に分配します。

自動化システムの準備

- 1 NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく 拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が、使用する 96 プレート類に直接か からないようにご注意ください。
- 2 Bravo デッキ4番と9番の上に、赤いアルミニウムインサートをのせます。
- 3 チラーの電源を入れ、0℃ にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに は少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。
- 4 384 ウェルアダプターを Bravo デッキ 6 番に置きます。
- 5 Bravo デッキ 4 番と 6 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4℃ に設定し ます(「Bravo デッキヒートブロックの温度設定」を参照してください)。Bravo デッキ 4 番と 6 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンでそれぞれ CPAC 2 1 と CPAC 2 2 に相当します。
- NOTE 40ページの制限酵素消化のインキュベーションでは、384 ウェルタイプのサーマルサ イクラーを使用します。SureCycler を使用する場合は、384 ウェルブロックがセットさ れていることを確認してください。サーマルサイクラーの加熱時間を短縮するために、 あらかじめ制限酵素消化に使うプログラムを 384 ウェルタイプのサーマルサイクラー に入力して開始し、自動化システムで制限酵素反応プレートを移すよう指示が出るま でのあいだ、プログラムを一時停止しておくと便利です。37°Cのインキュベーションセ グメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してください。40ページのス テップ14 でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時停止を解除してくだ さい。

DNAサンプルソースプレートの準備

NOTE 以下のプロトコルでは、反応に必要な50 ngと、ピペッティングによるロスを考慮し1.8 ng/止 x 32 µL = 57.6 ng の gDNA を 8 well に分注し、それぞれ異なる制限酵素反応を行います。本プロトコルで 57.6 ng より少ない gDNA を使用した場合、収量が低下し、頻度の低いアレルが検出されないことがあります。できるだけ正確に gDNA を 定量するために、Qubit 蛍光測定法のような蛍光による DNA 定量法を用いてください。

NOTE HaloPlex HS 自動化ターゲットエンリッチメントシステムのランでは、プレートの 1、2、 3、4、6、または 12 カラムが選択できます。試薬キットは 3、6、または 12 カラムで使 用した際に過不足ない容量になっています。使用するカラムの全ウェルに DNA サン プルを入れてください。

Qubit dsDNA BR Assay キットまたは PicoGreen 染色キットを用いて、gDNA サンプルの濃度を測定します。

それぞれのキットのマニュアルにしたがってください。

- NOTE FFPE 由来サンプルの場合は、それぞれのサンプルについて Agilent NGS FFPE QC キットを用いて、増幅可能な DNA の濃度と DNA の品質を測定して下さい。
- 2 各 gDNA サンプルを 10 mM Tris バッファー(pH 8.5)で 1.8 ng/µl になるように希釈します。
 - NOTE FFPE 由来サンプルの場合は 88 ページのガイドラインに沿って、適切なスタート DNA 量と DNA の定量方法を選択して下さい。 ターゲットエンリッチメント実験に 100 ng DNA が必要な FFPE 由来サンプルの場合 は、このステップで gDNA サンプルを 3.6 ng/µl になるように希釈し、次のステップ 3 で 32 µl を使用します。
- 3 ランで使用する gDNA サンプルプレートを準備します。フルスカートの 96 ウェル Eppendorf プレートにキット付属の Enrichment Control DNA (ECD) 1 サンプルと、23 サンプル(3 カラムラン)、47 サンプル(6 カラムラン)、または 95 サンプル(12 カラムラン)の gDNA サンプルを下記に従って入れます。
 - a フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートのウェル A1 にキットに付属している Enrichment Control DNA (ECD) を 32 μL 分注します。氷上に置きます。

3. サンプルの調製

b 同じフルスカート96 ウェル Eppendorf プレートの別のウェルにランで使用するgDNA サンプル をそれぞれ 32 µL ずつ入れます。gDNA サンプルは96 ウェルプレートにカラム単位でセットし、 A1 に入れた ECD につづいて B1 から H1 へ、次に A2 から H2 へ、最後に A12 から H12 と いう順番でセットするようにします。3 カラムランの場合の例を下に示します。gDNA を入れたフ ルスカート96 ウェル Eppendorf プレートは氷上に置きます。



REマスターミックスソースプレートの準備

Restriction Enzyme Master Mix Strip を調製します。

このステップでは、2 種類の酵素(Green Enzyme Strip と Red Enzyme Strip)、Restiction Enzyme (RE) Buffer、および BSA を 8 連チューブの各ウェルで混ぜ合わせて 8 種類の Restriction Enzyme (RE)マスターミックスを調製します。 図は 34 ページで説明している RE マスタ ーミックス Strip の調製法の、24 サンプル(3 カラムラン)の場合の作業の概要を示しています。 実際 の調製は p34 からの操作手順に従って行ってください。3 カラムランの場合には RE マスターミック ス Strip を 8 連チューブに作ることができます。6 カラム、12 カラムの場合は、1.5 ml チューブ 8 本 を使って作ります。



CAUTION REマスターミックスを調製する際に、Green Enzyme Strip, Red Enzyme Strip を それぞれ正しい向きで使用することが重要です。それぞれの Strip は緑色または赤 色で A の位置が標識されています。Green Enzyme Strip, Red Enzyme Strip の A-H の方向を間違えると、制限酵素切断パターンが変わってしまうため、実験は失敗 してしまいます。十分にご注意ください。

- 1 下の表に従って適切な量の RE (Restriction Enzyme) Buffer + BSA 混合液を 1.5 ml チューブや 2 ml チューブなどで調製します。
- 表 8 Digestion_v1.0.pro プロトコル用 RE Buffer + BSA 混合液の調製

Reagents	Volume for						
	1 Library	1 Column	2 Columns	3 Columns	4 Columns	6 Columna	12 Columns
RE Buffer	24.5 µL	294 µL	490 µL	784 µL	1078 µL	1568 µL	3038 µL
BSA Solution	0.5 µL	6 µL	10 µL	16 µL	22 µL	32 µL	62 µL
Total Volume	25 µL	300 µL	500 μL	800 µL	1100 μL	1600 μL	3100 μL

2 表 9に従って、8連チューブもしくは8本の1.5 ml チューブに1で調製した RE buffer+BSA 混合 液を使用するカラム数に応じた量を分注します。8連チューブの場合は、A の位置がはっきりわかる ようにチューブにマークをつけます。8本の1.5 ml チューブを使用する場合、各チューブにA からH までの記号をつけます。この8連チューブもしくは1.5 ml チューブを RE マスターミックスチューブと 呼びます。

次に Green Enzyme Strip (チューブAに緑色で標識してあります)のAからHのチューブから各 酵素をREマスターミックスチューブの対応するAからHのチューブに、表9に従ってサンプル (Reaction)数に応じた容量を加えます。AからHの向きを間違えないように注意してください。3カ ラムランの場合は、マルチピペットを使って一度に各酵素を加えることができます。

その次に Red Enzyme Strip (チューブAに赤色で標識してあります)のAからHのチューブから 各酵素をREマスターミックスチューブの対応するAからHのチューブに、表9に従ってサンプル (Reaction)数に応じた容量を加えます。AからHの向きを間違えないよう注意してください。3カラム ランの場合は、マルチピペットを使って一度に各酵素を加えることができます。

Reagent	Volume for	Volume for	Volume for	Volume for	Volume for	Volume for	Volume for
	1 Library	1 Column	2 Columns	3 Columns	4 Columns	6 Columna	12 Columns
RE Buffer + BSA	2.8 µL	36 µL	60.8 µL	90.4 µL	124 µL	180 µL	364 µL
Green Enzyme Strip	0.25	4.5 ul	76.01	11.2 ul	15 5 ul	22.5 ul	45.5 ul
enzyme A-H	0.35 µ∟	4.5 µL	7.0 µL	11.3 μ ∟	15.5 µL	22.5 µL	45.5 μL
Red Enzyme Strip	0.35 ul	4.5 ul	7.6 ul	11 3 ul	15.5 ul	22.5 ul	45.5 ul
enzyme A-H	0.55 μΕ	4.5 μL	7.0 μΕ	Π.5 μΕ	10.0 µL	22.0 με	40.0 μL
Total Volume for							
each Master Mix	3.5 µL	45 µL	76 µL	113 µL	155 µL	225 µL	455 μL
A,B,C,D,E,F,G, o H							

表 9 Digestion_v1.0.pro プロトコル用 RE マスターミックス A から H の調製

NOTE

1から6カラムランの場合、RE マスターミックス A から H は 0.2 mL の 8 連ストリッ プチューブにマルチチャンネルピペットを使って Green Enzyme Strip および Red Enzyme Strip から液を移して RE マスターミックスストリップを調製することができま す。A の位置がはっきりわかるように、チューブにマークをつけてください。12カラムラ ンの場合、マスターミックスは 1.5 mL チューブで調製してください。

3 穏やかにボルテックスで混ぜ、スピンダウンします。氷上におきます。

3. サンプルの調製

RE マスターミックスソースプレートの調製

1 図 3 に示すように RE マスターミックスをフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートに分注します。 表 10 に示された量の各マスターミックス A から H をフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートの 図 3 に示されたカラムの各ウェルに加えます。分注操作の間、マスターミックスは氷上に置くように して下さい。分注操作では、プレートの底に気泡を入れないように注意し、分注後にプレートの下か ら目視により気泡がないことを確認してください。

表 10 Digestion_v1.0.pro 用 RE マスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Source Plate						
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs	
RE Master Mix A	Column 1 (A1-H1)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix B	Column 2 (A2-H2)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix C	Column 3 (A3-H3)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix D	Column 4 (A4-H4)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix E	Column 5 (A5-H5)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix F	Column 6 (A6-H6)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix G	Column 7 (A7-H7)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	
RE Master Mix H	Column 8 (A8-H8)	5.1 µl	8.9 µl	12.6 µl	16.3 µl	23.7 µl	47.9 µl	



図 3 自動化プロトコル Digestion_v1.0.pro 用 RE マスターミックスソースプレートの準備
NGS 自動化システムの準備とDigestion_v1.0.pro VWorksプロトコルの実行

- デスクトップの HaloPlex_HS.VWForm ショートカットを使って HaloPlex HS セットアップフォームを 開きます。
- 2 VWorks ソフトウェアにログインします。

3 セットアップフォーム左上、Parameters の 1) Step から 01 Digestion_v1.0.pro を選択します。



- **4** 2) Number of columns of samples で処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、 または 12 カラムのランを選択できます。
- 5 3) Update layout and information をクリックします。
- 6 表 11 に従って Bravo デッキを準備します。
- 表 11 Digestion_v1.0.pro 用 Bravo デッキ初期配置

デッキの位置	· · 内容··································
1	空き
2	新しいチップボックス
3	12 カラムランの場合:空の 384 ウェル Eppendorf プレート(384 ウェルイン
	サートは不要)
	1-6 カラムランの場合:空き
4	gDNA サンプルが入ったフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレート、A1 が
	左上になるように赤いインサートに載せる
5	空き
6	384 ウェルインサートに載せた空の 384 ウェル Eppendorf プレート
7	空き
8	空のチップボックス
9	RE マスターミックスを入れたソースプレート(フルスカート 96 ウェル
	Eppendorf プレート)、赤いインサートに載せる

- 7 NGS 自動化システムがフォーム中央 Bravo Deck Setup と中央下 Information 領域に表示され ているようにセットアップされていることを必ず確認してください。 このステップでプレート類をセットアップする位置をダブルチェックするようにしてください。
- 8 Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番の未使用チップボックスと8番の使用済みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、Reset をクリックして下図の状態にします。

Current Tip State	
Select columns of unused tips (Box 2)	🔽 :チップあり
$\mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} \mathbf{v} $	
Select columns of used tips (Box 8)	📔 :チップなし
Reset Clear	

9 確認できたら Start をクリックしてランを開始します。ランを開始するとエラーが表示されます。詳細 は 20 ページを参照してください。



- NOTE ランを開始しても自動化システムの装置が反応せず、動作が Log に記録されている 場合、VWorks がシミュレーションモードで実行していないことを確認してください。詳 細については 21 ページを参照してください。
- 10 下に示すように VWorks によってダイアログボックスが表示されたら、2番のチップボックスを新しい チップボックスと交換し、8番の使用済みチップボックスを空のチップボックスと交換してください。チ ップボックスを交換したら、フォームの Current Tip State の Reset をクリックしてください。チップの 状態がアップデートされたことを確認したら、下に示すダイアログボックスの Continue をクリックし てください。

サンプル数によっては、ランの間に複数回、チップボックス交換のダイアログボックスが表示される ことがあります。

Check Tips	
CHANGE TIP BOXES	
Press RESET on form and CONTINUE to reset to Full boxes or press PAUSE to manually edit.	
	Current Tip State Select columns of unused tips (Box 2)
	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
User data entry:	Select columns of used tips (Box 8)
Pause and Diagnose	Reset Clear

NGS 自動化システムは各 gDNA サンプルと各 RE マスターミックスを 384 ウェル反応プレートで混ぜ合わせます。1 から6 カラムランの場合、384 ウェル制限酵素処理プレート 1 枚、12 カラムランの場合、384 ウェル制限酵素処理プレート 2 枚が調製されます。

11 自動化システムがランのための 384 ウェル制限酵素処理プレートを調製し終わったら、下に示すダ イアログボックスが表示されます。

調製された制限酵素処理プレートの最終的な Bravo デッキの位置はランサイズによって異なります。

Transfer plate to therm	al cycler
Get plate from position 3.0s.	6, seal at 165C for
Place in thermal cycler a program outlined in Use	and run the digestion er Guide.
After transferring the p below.	olate, click Continue
User data entry:	
Pause and Diagnose	Continue
	63.::

12 ダイアログボックスで示された Bravo デッキの位置から、384 ウェルプレートを取り出します。

13 PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでサンプルプレートをシールします。設定は 165℃、

3.0 秒です。 プレートをスピンダウンし、溶液をウェルの底に集めます。

14 シールしたプレートを予熱した 384 ウェルタイプのサーマルサイクラーにセットし、表 12 のプログラムを実行します。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。プレートをセットしたらダイアログボックスのContinue をクリックします。

表 12 HaloPlex HS 制限酵素反応時のサーマルサイクラープログラム

Step	Temperature	Time		
Step 1	37°C	30 minutes		
Step 2	4°C	Hold		

制限酵素処理プレートの調製には、1枚あたりおよそ30-45分かかります。

12カラムランの場合、2枚の384ウェルプレートが続けて調製されます。1枚目のプレートの調製が終わ るとダイアログボックスが出るので、すぐにサーマルサイクラーに移して反応を開始します。プレート1を サーマルサイクラーで30分間インキュベーションしている間に、自動化システムはプレート2の制限酵素 消化反応液の調製を始めます。ランの時間は計90分程度です。プレート1のサーマルサイクラープログ ラムが完了したら氷上に置き、プレート2のDigestion_1.0.proプロトコルとサーマルサイクラープログラ ムが完了するまでそのままにしておきます。

- 15 反応後の Enrichment Control DNA (ECD)を電気泳動で分析し、制限酵素処理の確認を行いま す。ECD 以外のサンプルは電気泳動を行わないため、その間氷上で保管します。12 カラムランの 場合は、2 枚目のプレートのサーマルサイクラープログラムが完了してから確認に進みます。
 - a ECD を制限酵素処理した反応液計 8 つを 4 µL ずつ、表 13 に示された 384 ウェル反応プレートの該当ウェルから、新しい 0.2-mL PCR チューブ(もしくは 8 連チューブ)に移します。
 12 カラムランの場合、8 つの ECD 制限酵素反応液のうち 4 つが 1 枚目の 384 ウェル反応プレートにあり、残りは 2 枚目の 384 ウェル反応プレートにあります。

Restriction Enzyme Master	Position of ECD Digestion Reaction in 384-Well Plates			
Nix to be Validated	1-6 Column Runs	12-Column Runs (two 384-well plates produced)		
RE Master Mix A	A1	A1 (plate 1)		
RE Master Mix B	A2	A2 (plate 1)		
RE Master Mix C	B1	B1 (plate 1)		
RE Master Mix D	B2	B2 (plate 1)		
RE Master Mix E	A13	A1 (plate 2)		
RE Master Mix F	A14	A2 (plate 2)		
RE Master Mix G	B13	B1 (plate 2)		
RE Master Mix H	B14	B2 (plate 2)		

表	13	電気泳動用に取り分ける、	制限酵素処理された各	ECD の位置

- **b** 8 連 PCR チューブにキャップをして、4 μL のサンプルをサーマルサイクラーにセットして、80°C で 5 分間加熱し、制限酵素を失活させます。
- c 2100 バイオアナライザ(42 ページ参照)、TapeStation (43 ページ参照)、またはゲル電気泳動(44 ページ参照)で、調製した ECD を分析します。

ECD サンプルには、gDNA と 800 bp の PCR 産物が含まれます。この PCR 産物は、HaloPlex HS キッ トで使用するすべての制限酵素の切断部位を含んでいます。未消化 DNA コントロールでは 2.5 kbp より 大きな gDNA のバンド及び 800 bp の PCR 産物のバンドが観察されます。制限酵素消化された ECD サンプルでは 100 から 2500 bp の間に gDNA 由来のスメアバンドが観察され、その上に約 125、225、 および 450 bp 付近の 3 つの主要なバンドが重なります。これらの 3 つのバンドは 800 bp の PCR 産物 に由来する制限酵素消化断片に相当し、8 種類の RE マスターミックスで切断した後の正確なサイズは、 それぞれ異なります。

NOTE 制限酵素消化した ECD サンプルのレーンには、約 125、225、および 450 bp の 3 つ の主要なバンド以外にマイナーなバンドが検出されることがあります。 3 つの主要なバンドが見られれば、制限酵素消化は成功しています。図4、図5、図6 に見られる程度の量のマイナーなバンドが見られても、ターゲットエンリッチメントの 結果には影響しません。 また、Digestion reaction B で得られるバンドの濃度が A, C-H よりも薄くなる場合が ありますが、結果には影響しません。

オプション 1: 2100 バイオアナライザ解析による確認

High Sensitivity DNA Kit (p/n 5067-4626)と2100 Expert Software (version B.02.07 以上)を使いま す。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。 <u>http://Agilentgenomics.jp</u>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

- 新しいチューブに0.5 uLの Enrichment Control DNA ストック溶液と3.5 uLの nuclease free water
 を混ぜ合わせて未消化 ECD コントロールを調製します。
- 2 チップ、サンプルおよびラダをガイドブックに従って調製します。1 µLの ECD サンプルを解析に使用してください。未消化 ECD コントロールにはサイズの大きい gDNA が含まれ、その後のレーンの結果に影響を与える場合があります。上記で8倍に希釈して調製した未消化 ECD コントロールは最後のレーンで泳動を行うことを推奨します。
- 3 調製が終わってから5分以内にチップを2100 バイオアナライザにセットし、ランを開始してください。

図 4 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。



図 4 2100 バイオアナライザ解析による制限酵素処理の確認。左端: ladder、レーン 1 – 8:制限酵素消化された ECD A – H、レーン 9:未消化 Enrichment Control DNA。

Stopping Point次のステップにすぐに進まない場合、-20°Cで長期保存ができます。この先、ページ65 の PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

オプション2:4200 TapeStation または 2200 TapeStation解析による確認

High Sensitivity D1000 ScreenTape (p/n 5067-5584)と試薬キット(p/n 5067-5585)を使用します。詳細については、2200 TapeStation User Manual を参照してください。

- 新しいチューブに1 uL の Enrichment Control DNA ストック溶液と1 uL の nuclease free water
 を混ぜ合わせて未消化 ECD コントロールを調製します。
- ユーザーマニュアルに示されているように TapeStation のサンプルを調製します。解析のための新 しいチューブストリップのウェル毎に 2 μL の各 ECD サンプルを入れ、2 μL の High Sensitivity D1000 Sample Buffer とよく混合します。
- CAUTION 正確な定量のために、DNAとHigh Sensitivity D1000 Sample Buffer を混ぜたサン プルは、TapeStation 付属のボルテックスミキサでプロトコルに指定の時間、付属の ボルテックスミキサをお持ちでない場合は、最高速度に設定して 10 秒間 x2 回、確実 に混合してください。
- ユーザーマニュアル示されているようにサンプルを含むチューブストリップ、High Sensitivity D1000
 ScreenTape、およびローディングチップを TapeStation にセットします。



図 5 に TapeStation での電気泳動結果の例を示します。

図 5 2200 TapeStation 解析での制限酵素処理の確認。レーン 1: TapeStation D1000 High-Sensitivity Ladder、レーン 2:未消化 Enrichment Control DNA、レーン 3 – 10:制限 酵素消化された ECD A – H。

Stopping Point次のステップにすぐに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、65 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

オプション 3: ゲル電気泳動による確認

Novex 6% ポリアクリルアミド TBE プレキャストゲルと 1X Novex TBE Running Buffer を使用します。 このステップの詳細については、製造元の提供するマニュアル等をご参照ください。

- 新しいチューブに 2 uL の Enrichment Control DNA ストック溶液と 2 uL の nuclease free water
 を混ぜ合わせて未消化 ECD コントロールを調製します。
- 1 µL の Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) を 4 µL の ECD サンプルそれぞれに加えます。
- 5 µL の各サンプルをゲルにのせます。1 つ以上の隣接するレーンに 200 ng の DNA molecular weight marker をのせます。
- 210 V で約 15 分間泳動します。
- 3X GelRed Nucleic Acid Stain でゲルを 10 分間染色し、UV 照射下でバンドを検出します。
 図 6 にゲル結果の例を示します。



図 6 ゲル電気泳動での制限酵素処理の確認。レーン 1 – 8:制限酵素消化された ECD A – H、レ ーン 9:未消化 Enrichment Control DNA、レーン 10: 25 bp DNA ladder。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、65 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

STEP2. HaloPlex HS プローブと制限酵素消化済み gDNA のハイブリダイゼーション

このステップでは、制限酵素消化した gDNA を HaloPlex HS プローブライブラリとハイブリダイズさせま す。ハイブリダイゼーション過程の間に、分子バーコードと、サンプルインデックス配列を含むイルミナシ ーケンシングモチーフがターゲット断片に取り込まれます。

HaloPlex HS プローブはゲノムのターゲット領域に由来する断片に選択的にハイブリダイズし、そのター ゲット DNA 断片を環状化させるように設計されています。ハイブリダイゼーションの時間は、デザインの プローブ数によって決まります。キットに入っている Certificate of Analysis にハイブリダイゼーション時 間が 2 時間または 16 時間のどちらであるか記載されています。

サンプルインデックスプライマーの割り当てについては、Reference の HaloPlex HS Index の塩基配列 を参照してください。HaloPlex HS Target Enrichment System で使用するインデックスの塩基配列が列 挙されています。

自動化システムの準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 1 番にセットします。
- 3 銀色の Nunc プレートインサートを Bravo デッキ 9 番にセットします。
- 4 チラーの電源を入れ、0℃ にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに は少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。
- 5 サンプル数に関わらず、384 ウェルインサートを Bravo デッキ4番に置きます。Bravo デッキ4番の 温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4℃ に設定します(「Bravo デッキヒートブ ロックの温度設定」を参照してください)。

12 カラムランの場合のみ、2 つ目の 384 ウェルインサートを Bravo デッキ 6 番に置き、Bravo デッ キ 6 番の温度を 4℃ に設定します。

NOTE 50 ページのハイブリダイゼーションで使用するサーマルサイクラーの加熱時間を短縮するために、あらかじめ 96 ウェルタイプのサーマルサイクラーにハイブリダイゼーションプログラムを入力して開始し、後でプレートを移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利です。95℃のインキュベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してください。50 ページのステップ 11 でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時停止を解除してください。

Hybridization_v1.0.pro 用マスターミックスソースプレートの調製

1 下の表に従って試薬を混ぜ合わせ、ハイブリダイゼーションマスターミックスを調製します。 ボルテックスでよく撹拌し、スピンダウンします。

表 14 Hybridization_v1.0.pro 用のハイブリダイゼーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
HaloPlex HS or ClearSeq HS Probe	5 µl	63.8 µl	106.3 µl	148.8 µl	191.3 µl	276.3 µl	552.5 µl
Hybridization Solution	34 µl	433.5 µl	722.5 µl	1011.5 µl	1300.5 µl	1878.5 µl	3757.0 µl
Total Volume	39 µl	497.3 µl	828.8 µl	1160.3 µl	1491.8 µl	2154.8 µl	4309.5 µl

2 Nunc DeepWell プレートにハイブリダイゼーションマスターミックスソースプレートを調製します。表 15 の量のハイブリダイゼーションマスターミックスを Nunc DeepWell プレートのカラム 1 の A-H に 加えます。分注したら、ウェルの底に気泡がないことを目視により確認してください。

表 15 Hybridization.pro 用ハイブリダイゼーションマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc DeepWell Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Hybridization Master Mix	Column 1 (A1-H1)	57.3 µl	98.7 µl	140.2 µl	181.6 µl	264.5 µl	533.8 µl



インデックスプライマーカセットを加えたハイブリダイゼーション反応プレートの調製

 ハーフスカート96 ウェル Eppendorf プレート(青)の、インデックスを付加しようとしているサンプル に相当するウェル位置に、5 µLの適切な Indexing Primer Cassette を入れます。プレートは氷上に 置きます。

それぞれのウェルには Indexing Primer Cassette を1種類だけいれます。マルチプレックスで同時 にシーケンスするサンプルにはそれぞれ異なる番号のインデックスを使用してください。各ウェルに 加えた Indexing Primer の番号と各サンプルの対応を後のシーケンス解析のために記録しておき ます。

このプレートをハイブリダイゼーション反応プレートと呼びます。

NOTE

- 増幅前に分子バーコードをDNA断片に取り込むために必要なものは HaloPlex HS Indexing Primer 溶液に全て含まれています。
- 2 ECD コントロールサンプルは電気泳動での確認に使用した分、ボリュームが減っているので、1 で Indexing Primer を入れたハイブリダイゼーション反応プレートのウェル A1 に nuclease-free water を 32 µL 加えます(ウェル A1 には上のステップ 1 から 5 µL の Indexing Primer が入っています)。

Agilent NGS 自動化システムの準備とHybridization_v1.0.pro VWorksプロトコルの実行

- 1 VWorks HaloPlex HS フォーム上の 1) Step で 02 Hybridization_v1.0.pro を選択します。
- 2 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- 3) Update layout and information をクリックします。
- 4 表 16 に従って Bravo デッキの準備をします。

デッキの位置	
1	Indexing Primer Cassette を入れたハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレ
	ート(青)、赤いインサートに載せる
2	新しいチップボックス
3	空き
4	384 ウェル Eppendorf プレートに入った、制限酵素消化済み gDNA サンプ
	ル、384 ウェルインサートに載せる
5	新しいフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレート
6	12 カラムランの場合:384 ウェル Eppendorf プレートに入った、制限酵素消
	化済み gDNA サンプル(プレート 2)、384 ウェルインサートに載せる
	1-6 カラムランの場合:空き
7	空き
8	空のチップボックス
9	ハイブリダイゼーションマスターミックスソースプレート(Nunc Deep Well プ
	レート)、銀色のインサートに載せる

表 16 Hybridization_v1.0.pro 用 Bravo デッキの初期構成

- 5 NGS 自動化システムがフォームの Bravo Deck Setup と Information 領域の表示の通りにセット アップされていることを必ず確認してください。
- 7オームの Current Tip State の表示が Bravo デッキ 2 番の未使用チップボックスと8 番の使用 済みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、 Reset をクリックして下図の状態にします。



7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



NGS 自動化システムは、各 gDNA サンプルの 8 種類の制限酵素消化反応液とハイブリダイゼーション マスターミックスおよび適切な Indexing Primer を、96 ウェルプレートのウェルで混合します。

8 自動化システムによるハイブリダイゼーション反応プレートの準備が完了したら、下に示すダイアロ グボックスが表示されます。



- 9 PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでサンプルプレートをシールします。設定は 165℃、
 3.0 秒です。
- **10** プレートをスピンダウンします。この時点で、ハイブリダイゼーション反応液の量は 100 µl になって います。
- 11 シールしたプレートを96 ウェルタイプのサーマルサイクラーにセットし、表 17 のハイブリダイゼーションプログラムを実行します。プローブ数により、Step 2 の時間が異なります。Certificate of Analysis で Step 2 の時間を確認してください。

Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。表 17 のプログラムの実行後に低温で Hold しないようにご 注意ください。また、規定のハイブリダイゼーション時間(2 時間あるいは 16 時間)よりも長時間 58℃でインキュベーションしないでください。

プレートをセットしたらダイアログボックスの Continue をクリックし、プロトコルを完了させます。

Step	Temperature	Time (Duration of Step)			
		Designs with <20,000 probes (see Certificate of Analysis)	Designs with >20,000 probes (see Certificate of Analysis)		
Step 1	95°C	5 minutes	5 minutes		
Step 2	58°C	2 hours	16 hours		

表 17 HaloPlex HS プローブハイブリダイゼーションのサーマルサイクラープログラム*

- + デザインサイズが 1-500 kb で、かつ、プローブ数が 20,000 未満の場合、58℃で2 時間のハイブリダ イゼーションを行います。1-500 kb のデザインではプローブ数が 20,000 未満になり2 時間のハイブ リダイゼーションになるのが典型的ですが、必ずキット付属の Certificate of Analysis を参照してくだ さい。終了後は、速やかに次のステップを実行してください。
- # デザインサイズが 501 kb 5 Mb の場合、およびデザインサイズが 1-500 kb でもプローブ数が 20,000 以上の場合は 58℃で 16 時間のハイブリダイゼーションを行います。必ずキット付属の Certificate of Analysis を参照してください。ハイブリダイゼーション終了後は、速やかに次のステッ プを実行してください。
- ハイブリダイゼーションが終了する少なくとも30分前に、プロトコルのこの後のステップで使用する 試薬を冷蔵庫または冷凍庫から取り出し、適切な温度に置きます。
 - -20°Cの冷凍庫から HS Hybridization Stop Solution、HS Ligation Solution、HS Capture Solution、HS Wash 1 Solution、HS Wash 2 Solution、HS Elution Buffer を取り出します。
 溶けたら濃度が均一になるように転倒混和します。
- NOTE HS Hybridization Stop Solution は使用前に室温になっていることを確認して下さい。この溶液は粘性が高いため、低温だと正確な液量をマイクロピペッターで取ることができません。
 - +4°Cの冷蔵庫から Agencourt AMPure XP magnetic beads と Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads を取り出します。
 - -20°Cの冷凍庫から取り出した 10 mM rATP、HS DNA Ligase は氷上に置きます。

STEP3. ハイブリダイゼーションバッファの除去と環状化ターゲット断片のライゲーション

このステップでは、AMPure XP beads を用いてハイブリダイゼーションバッファの除去を行い、DNA Ligase によってハイブリダイゼーション後の環状化産物の中のプローブとターゲット断片の間のニックを 閉じます。

自動化システムの準備

- 1 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。
- 3 銀色の Nunc プレートインサートを Bravo デッキ 9 番にセットします。
- 4 チラーの電源を入れ、0℃にセットします。Bravo デッキの9番が相当します。チラーリザーバーには 少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。

精製試薬の準備

- 5 45 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Tharmo Scientific リザーバーを準備します。
 リザーバーの側面に印をつけることをお勧めします。
 1 日に使用する分の 70%エタノールであれば、まとめて調製して密閉できる容器で保存して使用可能です。1 日以上保存しないようにしてください。
- 6 AMPure XP ビーズを少なくとも 30 分間、室温に置いたことを確認してください。室温に戻したビー ズ溶液の状態や色が均一になるまでよく混合します。
- **7** 表 18 にしたがって、AMPure XP ビーズとHS Hybridization Stop Solution の混合液を調製しま す。均一になるまでボルテックスでよく混合します。
- 表 18 AMPure XP ビーズ+ HS Hybridization Stop Solution 混合液の調製

Reagents	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columna	Volume for 12 Columns
AMPure XP beads	0.08 mL	0.72 mL	1.4 mL	2.12 mL	2.84 mL	4.2 mL	8.4 mL
HS Hybridization Stop Solution	0.02 mL	0.18 mL	0.35 mL	0.53 mL	0.71 mL	1.05 mL	2.1 mL
Total Volume	0.1 mL	0.9 mL	1.75 mL	2.65 mL	3.55 mL	5.25 mL	10.5 mL

- NOTE HS Hybridization Stop Solution は粘性が高いため、ゆっくりとピペッティングを行い、必要量を吸引、排出するようにしてください。ピペットチップに溶液が残っていないことを確認してください。
- 8 表 18 で準備した AMPure XP ビーズ + HS Hybridization Stop Solution 混合液を 100 μL を、Nunc DeepWell プレートの使用する各ウェルに入れます。

ライゲーションマスターミックスソースプレートの準備

- キットに含まれる 10 mM rATP を nuclease-free water で希釈し、1 mM rATP 溶液を調製します。
 表 19 を参照し、サンプル数に合わせて必要量の 1 mM rATP 溶液を調製してください。
- 2 表 19 を参照し、必要量のライゲーションマスターミックス を調製してください。
 穏やかにボルテックスを行ってよく混合し、軽くスピンダウンして溶液を集めます。

表 19 ライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	36.9 µl	470.5µl	784.1 µl	1097.8µl	1411.4 µl	2038.7 µl	4077.5 µl
1 mM rATP (from step 1)	0.6 µl	7.7 µl	12.8 µl	17.9 µl	23.0 µl	33.2 µl	66.3 µl
HS Ligation Solution	10 µl	127.5 µl	212.5 µl	297.5 µl	382.5 µl	552.5 µl	1105 µl
HS DNA Ligase	2.5 µl	31.9 µl	53.1 µl	74.4 µl	95.6 µl	138.1 µl	276.3 µl
Total Volume	50 µl	637.6 µl	1062.5 µl	1487.6 µl	1912.5 µl	2762.5 µl	5525.1 µl

3 Hybridization_v1.0.pro のランで使用したものと同じ Nunc DeepWell プレートを用いて、 Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.pro のためのマスターミックスソースプレートを準備します。 表 20 に示す量のライゲーションマスターミックスを、Nunc DeepWell プレートのカラム 2 のすべての ウェルに入れてください。

表 20	Hyb_Purification_	_&_Ligation_\	v1.0.pro のた	こめのマスタ-	ーミックスソ-	ースプレートの準備
------	-------------------	---------------	-------------	---------	---------	-----------

Master Mix Solution	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc DeepWell					e Plate			
	Source Plate	1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs			
Ligation Master Mix	Column 2 (A2-H2)	73.4 µl	126.6 µl	179.7 µl	232.8 µl	339.1 µl	684.4 µl			

Agilent NGS 自動化システムの準備と Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.proVWorks プロトコルの実行

- 1 VWorks HaloPlex HS フォーム上の 1) Step で 03 Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.pro を選択します。
- 2 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- **3** 3) Update layout and information をクリックします。
- 4 表 21 に従って Bravo デッキの準備をします。
- 表 21 Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.pro 用 Bravo デッキの初期構成

デッキの位置	内容
1	空の廃液リザーバー (Axgen 96 Deep Well Plate, square wells)
2	新しいチップボックス
3	70% エタノールが入った Thermo Scientific リザーバー
4	空き
5	AMPure XP ビーズ +HS Hybridization Stop Solution 混合液が入った Nunc
	DeepWell ソースプレート
6	赤いインサート
7	空き
8	空のチップボックス
9	ライゲーションマスターミックスソースプレート(Nunc Deep Well プレート)、
	銀色のインサートに載せる

- 5 NGS 自動化システムがフォーム中央の Bravo Deck Setup と Information 領域の表示の通りに セットアップされていることを確認してください。
- 5 フォームの Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番の未使用チップボックスと8番の使用済 みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、
 Reset をクリックして下図の状態にします。



7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



8 下に示すダイアログボックスが表示されたら、ハイブリダイゼーションプレートをサーマルサイクラー から取り出し、軽くスピンダウンをして溶液を集めます。

シールをはがし、プレートを Bravo デッキの 6 番の赤いインサートの上に乗せます。

Place Hybridization Plat	e
Place Hybridized DNA in twin.tec half skirted play position 6	96 Eppendorf te on red insert at
User data entry:	
Pause and Diagnose	<u>C</u> ontinue

ここでは、ハイブリダイゼーション後のプローブ - ターゲット DNA の精製を行います。

このランの間に下記の試薬を-20 °C 冷凍庫より出します。

- STEP4. ターゲット DNA のキャプチャと洗浄で使用する試薬
 - Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁性ビーズ
 - HS Capture Solution
 - HS Wash 1 Solution
 - HS Wash 2 Solution

○ STEP5. キャプチャしたターゲットライブラリの PCR による増幅で使用する試薬(表 28)

このプロトコルを実行している間に、p57.3 - p59.10 にある、ストレプトアビジン磁性ビーズを Capture Solution に縣濁したビーズ縣濁液や、Wash 1 mix などの作成を進めます。

9 下に示すダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ6番のハイブリダイゼーションプレートを 取り出して、廃棄してください。プロトコルのライゲーションステップで使う新しいハーフスカート96ウ ェル Eppendorf プレート(青)を赤いインサートの上に乗せてください。

Replace Hybridization Plate				
Remove the DNA plate from position 6 and replace the plate with a new 96 Eppendorf twin.tec half skirted plate.				
When finished, click Continue below.				
User data entry:				
Pause and Diagnose Continue				
.:				

10 このあと、自動化システムはライゲーション反応の準備のための分注を行います。ライゲーションプ レートが準備できたら、下に示すダイアログボックスが表示されます。



- 11 Bravo デッキ 6 番からサンプルプレート(ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレート(青))を取り出 し、PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールします。設定は 165℃、3.0 秒です。
- 12 シールしたプレートをサーマルサイクラーにセットし、55℃で 10 分間インキュベーションします。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。液量は 50 uL です。
 10 分間のインキュベーションの後に低温での Hold ステップは加えないように注意してください。

STEP4. ターゲット DNA のキャプチャと洗浄

このステップでは、ビオチン化されたターゲット DNA と HaloPlex HS プローブのハイブリッドをストレプトア ビジンビーズでキャプチャします。

自動化システムの準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。

ストレプトアビジンビーズソースプレートの準備

- Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁性ビーズをボルテックスミキサでしっかり攪拌します。磁性ビーズは保管中に沈殿していますので、容器の底に沈殿が残らないようによく攪拌してください。
- 4 磁性ビーズを洗浄します。
 - a. 表 22 に従って、1 サンプルあたり40 µL(+余剰分)の Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁
 性ビーズを 1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルに移します。

表 22 キャプチャのための Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁性ビーズ懸濁液の量

Reagents	Volume for 1	Volume for 1	Volume for 2	Volume for 3	Volume for 4	Volume for 6	Volume for
	Library	Column	Columns	Columns	Columns	Columna	12 Columns
Streptavidin T1 Magnetic Beads	0.04 mL	0.42 mL	0.8 mL	1.1 mL	1.5 mL	2.2 mL	4.2 mL

- b. 1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルを適切な磁石スタンドに5分間置きます。
- c. 溶液が透明になったことを確認したら、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み 液をピペットで取り除きます。
- d. 1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルを磁石スタンドから取り出します。表 23 に従って HS Capture Solution をビーズに加え、ピペッティングで再懸濁させます。

表 23 ビーズ懸濁液に加える Capture Solution の量

Reagents	Volume for 1	Volume for 1	Volume for 2	Volume for 3	Volume for 4	Volume for 6	Volume for
	Library	Column	Columns	Columns	Columns	Columna	12 Columns
HS Capture Solution	0.04 mL	0.42 mL	0.8 mL	1.1 mL	1.5 mL	2.2 mL	4.2 mL

5 Capture Solution に懸濁したストレプトアビジン磁性ビーズをNunc DeepWell ソースプレートに分注 します。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、

40 µL の均一なビーズ懸濁液を加えます。プレートの底に気泡が入っていないことを目視で確認します。

6 ストレプトアビジンソースプレートを Bravo デッキ 5 番に置きます。

ビーズ懸濁液を分注する際、ビーズ懸濁液が均一で、チューブの底に固まったビー NOTE ズがないことを目で確認してください。もし固まりがあれば、使用前にボルテックスと ピペッティングで完全に再懸濁させてください。

Wash 1 mix の調製

 7 次のステップで使用する、新しい1 M NaOH を準備します。
 表 24 を参照し、サンプル数に合った量の1 M NaOH を、10 M 以上の NaOH ストック溶液から用時 調製します。

CAUTION 高品質で正しい濃度の NaOH を使用することが、DNA の溶出・回収を適切に行うために非常に重要です。

- 10 M より低い濃度で保存した NaOH ストック溶液を使用しないでください。
- 1 M NaOH 溶液を入れた容器は使用しない時にはシールし、空気に曝さないようにしてください。特にサンプル数が多い場合にはご注意ください。

表 24 サンプル数ごとの 1M NaOH の量

| Volume for |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 Library | 1 Column | 2 Columns | 3 Columns | 4 Columns | 6 Columns | 12 Columns |
| 11 µl | 99 µl | 187 µl | 275 µl | 363 µl | 550 µl | 1.1 ml |

8 表 25 を参照し、HS Wash 1 と NaOH の混合液を調製します。

表 25 HS Wash 1 と NaOH 混合液の調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
HS Wash 1 Solution	99 µl	891 µl	1683 µl	2475 µl	3267 µl	4950 µl	9.9 ml
1 M NaOH (prepared in step 7)	11 µl	99 µl	187 µl	275 µl	363 µl	550 µl	1.1 ml
Total Volume	110 µl	990 µl	1870 µl	2750 µl	3630 µl	5500 µl	11.0 ml

洗浄溶液ソースプレートの調製

9 フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを使って、表 26 の 2 種類の洗浄溶液ソースプレートを準

備します。使用する各ウェルに、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、各溶液を フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートに入れてください。

表 26 Capture_&_Wash_v1.0.pro プロトコルのためのソースプレートの準備

Solution	Volume to dispense per well of source plate
HS Wash 1 + NaOH Mix from step 8	110 µl
HS Wash 2 Solution	160 μl

10 45 mL の Nuclease Free Water を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。

Agilent NGS 自動化システムの準備と Capture_&_Wash_v1.0.pro VWorks プロトコルの実行

- 1 VWorks HaloPlex HS フォーム上の 1) Step で 04 Capture_&_Wash_v1.0.pro を選択します。
- 2 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- 3) Update layout and information をクリックします。
- 4 表 27 に従って Bravo デッキの準備をします。

表 27 Capture_&_Wash_v1.0.pro 用 Bravo デッキの初期設定

デッキの位置	
1	空の廃液リザーバー (Axgen 96 Deep Well Plate, square wells)
2	新しいチップボックス
3	HS Wash 1 + NaOH Mix ソースプレート(フルスカート 96 ウェル Eppendorf プ
	レート)
4	HS Wash 2 ソースプレート(フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレート)
5	HS Capture Solution に懸濁した StreptavidinT1 磁性ビーズ(Nunc DeepWell
	ソースプレート)
6	赤いインサート
7	空き
8	空のチップボックス
9	Nuclease-free water 45 mL を入れた Thermo Scientific reservoir

5 NGS 自動化システムがフォーム中央の Bravo Deck Setup と Information 領域の表示の通りに セットアップされていることを確認してください。

 6 フォームの Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番の未使用チップボックスと8番の使用済 みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、
 Reset をクリックして下図の状態にします。

Current Tip State]
Select columns of unused tips (Box 2)	🔽 :チップあり
V V V V V V V V V V	
Select columns of used tips (Box 8)	📔 :チップなし
Reset Clear	

7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



8 下に示すダイアログボックスが表示されたら、ライゲーションプレートをサーマルサイクラーから取り 出します。

シールをはがし、プレートを Bravo デッキの 6 番の赤いインサートの上に乗せます。

Place Ligation Plate	Jon prov	
Place Ligated DNA in 96 Eppendorf twin.tec half skirted plate on red insert at position 6		
User data entry:		
Pause and Diagnose	<u>C</u> ontinue	

Agilent NGS 自動化システムはストレプトアビジンビーズによるターゲット DNA のキャプチャのための 分注と、キャプチャした DNA の洗浄操作を行います。 完了するとキャプチャ、洗浄した DNA は Bravo デッキ5番の Nunc DeepWell プレートに入った状態になります。

STEP5. キャプチャしたターゲットライブラリの PCR による増幅

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムはキャプチャされた DNA ターゲットライブラリの PCR 増幅のための分注操作を行います。

NOTE 65 ページの PCR で使用するサーマルサイクラーの加熱時間を短縮するために、あ らかじめ 96 ウェルタイプのサーマルサイクラーに PCR プログラムを入力して開始し、 後でプレートを移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利です。 98°Cのインキュベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止 してください。65 ページのステップ 15.b でプレートをサーマルサイクラーに移したら、 直ちに一時停止を解除してください。

自動化システムの準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。
- 3 銀色の Nunc プレートインサートを Bravo デッキ 9 番にセットします。
- 4 Bravo デッキ 6 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4℃に設定します。 Bravo デッキ 6 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2.2 に相当します。 「Bravo デッキヒートブロックの温度設定」を参照してください。
- 5 チラーの電源を入れ、0℃にセットします。Bravo デッキの9番が相当します。チラーリザーバーには 少なくとも 300 mL の 25% エタノールが入っていることを確認してください。

Amplification_v1.0.pro のための PCR マスターミックスソースプレートの調製

6 表 28 にしたがって、適切な量の PCR マスターミックスを調整します。
 穏やかにボルテックスして、マスターミックスをよく混合し、スピンダウンをします。

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	3.2 µl	40.8 µl	68.0 µl	95.2 µl	122.4 µl	176.8 µl	353.6 µl
Herculase II Reaction Buffer	30 µl	382.5 µl	637.5 µl	892.5 µl	1147.5 µl	1657.5 μl	3315 µl
100 mM dNTP Mix	0.8 µl	10.2 µl	17.0 µl	23.8 µl	30.6 µl	44.2 µl	88.4 µl
Primer 1	4 µl	51.0 µl	85.0 µl	119.0 µl	153.0 µl	221.0 µl	442 µl
Primer 2	8 µl	102 µl	170 µl	238 µl	306 µl	442 µl	884 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase	4 µI	51.0 µl	85.0 µl	119.0 µl	153.0 µl	221.0 µl	442 µl
Total Volume	50 µl	637.5 µl	1062.5 µl	1487.5 µl	1912.5 µl	2762.5 µl	5525 µl

表 28 Amplification_v1.0.pro のための PCR マスターミックスソースプレートの準備

- 7 Hyb_Purification_&_Ligation_v1.0.proの自動化ランで使用したのと同じNunc DeepWell プレートを用いて、Amprification_v1.0.proのためのPCRマスターミックスソースプレートを準備します。
 表 29に示す量のPCRマスターミックスをNunc DeepWell プレートのカラム3のすべてのウェルに加えます。
- 表 29 Amprification_v1.0.pro のためのマスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
PCR Master Mix	Column 3 (A3-H3)	73.4 µl	126.6 µl	179.7 µl	232.8 µl	339.1 µl	684.4 µl

Agilent NGS 自動化システムの準備と Amprification_v1.0.pro VWorks プロトコルの実行

- 8 VWorks HaloPlex HS フォーム上の 1) Step で 05 Amprification_v1.0.pro を選択します。
- 9 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- **10** 3) Update layout and information をクリックします。
- 11 表 30 に従って Bravo デッキの準備をします。

表 30 Amprification_v1.0.pro 用 Bravo デッキの初期設定

デッキの位置	内容
1	空き
2	新しいチップボックス
3	空き
4	空き
5	キャプチャ、洗浄した DNA サンプルが入った Nunc DeepWell プレート
6	新しいハーフスカート 96 ウェル Eppendorf (青)、赤いインサートに載せる
7	空き
8	空のチップボックス
9	マスターミックスソースプレート(Nunc Deep Well プレート)、シルバーインサ
	ートに載せる

- **12** NGS 自動化システムがフォーム中央の Bravo Deck Setup と Information 領域の表示の通りに セットアップされていることを確認してください。
- 13 フォームの Current Tip State の表示が Bravo デッキ 2 番の未使用チップボックスと8 番の使用 済みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、 Reset をクリックして下図の状態にします。



14 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



15 NGS 自動化システムによる PCR 反応液の準備が終わると、下に示すダイアログボックスが表示さ

れます。

Plate ready to seal	
The PCR plate at Bravo Position 6 is ready to be sealed and placed in the thermocycle for amplification.	er
User data entry:	
Pause and Diagnose Continue	

- a. Bravo デッキ 6 番からサンプルプレート(ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf (青)) を取り出し、 PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールします。設定は 165℃、3.0 秒です。
- b. シールしたプレートをサーマルサイクラーにセットし、表 31 に示す PCR プログラムを実行します。
 Hot Top(加熱式の蓋)を使用します。液量は 100 uL です。

表 31 HaloPlex HS キャプチャ後 DNA 増幅 PC	/R プログラム
-----------------------------------	----------

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	Obtain cycle number	98°C	30 seconds
fro Ar	from Certificate of Analysis	60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	8°C	Hold

最適な増幅サイクル数は HaloPlex HS, ClearSeq Halo HS の各プローブデザインごとに異なります。 キット付属の certificate of analysis に記載された推奨サイクル数を参照して下さい。

- c. サーマルサイクラーの PCR プログラムを開始したら、VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックし、自動化プロトコルを終了させます。
- d. 続けて次のステップの PCR 産物の精製に進む場合は、Agencourt AMPure XP ビーズを冷蔵
 庫から取り出します。PCR 増幅の間に AMPure XP ビーズを室温に戻します。
- Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、PCR 産物は-20℃で 72 時間または 8℃で 一晩まで保存ができますが、ベストな結果を得るためには、PCR 産物をできるだけ 早く精製してください。

STEP6. 増幅したターゲットライブラリの精製

このステップでは、増幅したターゲット DNA サンプルを、NGS 自動化システムで AMPure XP ビーズを 使用して精製します。

自動化システムと試薬の準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。
- Bravo デッキ 4 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 45℃に設定し、 Bravo デッキ 6 番の温度を 4℃に設定します。
 Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1、Bravo デッキ 6 番 は CPAC 2 2 が相当します。
 「Bravo デッキヒートブロックの温度設定」を参照してください。
- 4 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4℃ 保存)を室温に戻しておくようにします。

AMPure XP ビーズは凍らさないようにして下さい。

- 5 室温になった AMPure ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- AMPure XP ビーズと nuclease-free water の混合液を含む Nunc DeepWell ソースプレートを調 製します。
 - a. 使用する各ウェルに 100 μL の均一な AMPure XP ビーズを Nunc DeepWell プレートのウェ ルに入れます。
 - b. AMPure XPビーズを入れたNunc DeepWell プレートの各ウェルに40 µLの nuclease-free water を加えます。
- 7 45 mL の用時調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- フルスカート96 ウェル Eppendorf プレートの使用する各ウェルに、45 μL の HS Elution Buffer を 入れます。

Agilent NGS 自動化システムの準備と Capture_&_Wash_v1.0.pro VWorks プロトコルの実行

9 VWorks HaloPlex HS フォーム上の 1) Step で 06 Final_Purification_v1.0.pro を選択します。

- 10 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- 11 3) Update layout and information をクリックします。
- 12 表 32 に従って Bravo デッキの準備をします。
- 表 32 Final_Purification__v1.0.pro 用 Bravo デッキの初期設定

デッキの位置	内容
1	空の廃液リザ―バ―(Axygen 96 deep Well Plate, square wells)
2	新しいチップボックス
3	HS Elution Buffer が入ったフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレート
4	空き
5	AMPure XP ビーズ+nuclease-free water 混合液が入った Nunc DeepWell プ
	レート
6	増幅した DNA サンプルが入ったハーフスカート 96 ウェル Eppendorf (青)、
	赤いインサートに載せる
7	空き
8	空のチップボックス
9	70% エタノール 45 mL が入った Thermo Scientific リザーバー

- 5 NGS 自動化システムがフォーム中央の Bravo Deck Setup の表示の通りにセットアップされている ことを確認してください。
- 6 フォームの Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番の未使用チップボックスと8番の使用済 みチップボックスの状態と合っていることを必ず確認してください。異なる状態になっている場合、
 Reset をクリックして下図の状態にします。



7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



Agilent NGS 自動化システムは増幅したターゲット DNA の精製を行います。

8 下に示すダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ3番の Elution buffer ソースプレートを取り出し、廃棄してください。

新しいフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを Bravo デッキ3番に置いてください。

VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックします。

Replace Elution Plate			
Remove the elution buffer plate from position 3 and replace with a new 96 Eppendorf twin.tec PCR plate.			
Click Continue below.			
User data entry:			
Pause and Diagnose Continue			

 9 NGS 自動化システムが最後の溶出を終えると、下に示すダイアログボックスが表示されます。
 VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックして、プロトコルを終了します。
 精製後の DNA サンプルは Bravo デッキ 3 番のフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートにあり ます。液量は 40 uL です。
 精製前の PCR 産物が 60 uL、デッキ 6 番のハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレートに残って います。トラブルシューティングのため、最後まで保管しておきます。

Samples are ready			
The eluted samples are ready.			
Get the sample plate from position 3.			
Click Continue below to finish the protocol.			
User data entry:			
Pause and Diagnose Continue			

Stopping Point次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは-20°C で長期保存(1 年まで)で
きます。保存した DNA は、凍結融解を繰り返さないようにしてください。

STEP7. ターゲットエンリッチメントの確認

調製したライブラリサンプルをプールし、シーケンスする前にそれぞれのライブラリサンプルの濃縮の確認と濃度の定量を、2100 バイオアナライザ(72 ページ参照)または TapeStation (74 ページ参照)を用いて行います。

期待される結果

調製したライブラリの各アンプリコンは、イルミナプラットフォームで使用するマルチプレックスシーケンシングのために必要なシーケンスモチーフに、ターゲット配列がインサートとして挟まれた形となっています。

図 7 HaloPlex HS で濃縮したターゲットアンプリコンの構成

各アンプリコンは、1 つのターゲットインサート(青)を含み、その両側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)およびライブラリブリッジ PCR プライ マー(黄)があります。



アンプリコンのサイズは 190 bp から 640 bp の範囲となり、大部分のアンプリコンは 225 bp から 540 bp の範囲に分布します。アンプリコンのサイズ分布は DNA サンプルやプローブデザインによって異なりますが、定量には、175 bp から 625 bp の間のアンプリコンを用いてください。この範囲をはずれるピークが観察されても、定量の対象には含めないでください。

オプション 1: 2100 バイオアナライザ解析による確認

High Sensitivity DNA Kit (p/n 5067-4626)と2100 Expert Software (version B.02.07 以上)を使いま す。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。 <u>http://Agilentgenomics.jp</u>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

チップ、サンプルおよびラダーをガイドブックに従って調製します。1 μL のライブラリサンプルを解析に使用してください。

- 1 調製が終わってから5分以内にチップを2100 バイオアナライザにセットし、ランを開始してください。
- 2 各サンプルのエレクトロフェログラムを解析します。
 - エレクトロフェログラムで、およそ 225 から 540 bp の間に断片が分布していることを確認します。
 - エレクトロフェログラムの 175 bp-625 bp のサイズのピークに対してインテグレーション機能を 使って、各ライブラリプールの濃度を算出します。175 bp 以下のピークが観察される場合もあ りますが、定量には含めません。
 - デザインによっては 140 bp 付近に大きなピークが出ることがあります。140 bp のピークはアダ プターダイマーに由来し、クラスターは形成されるもののゲノムにマップできるシークエンスは 得られません。140 bp 付近のピークのモル濃度が全体の 10%以上になる場合は、サンプル をプールした後に再度以下の方法で AMPure ビーズ精製を行います。
 - 1, 各サンプルで 175 -625 bp のピークの濃度を決定し、この濃度に従って等モルになるようにプールします。
 - 2, プールしたサンプルのうち 40 µL を使用して、AMPure 精製を行います。



図 8 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。

図 8 2100 バイオアナライザ解析による HaloPlex HS エンリッチメントの確認
NOTE

バイオアナライザ High Sensitivity DNA Kit で測定した濃度が 10 ng/µL より高い場 合はサンプルを 10 倍希釈して再度測定を行います。サンプルの希釈には TE バッフ アー(10 mM Tris, 1 mM EDTA)を使用し、2000 rpm の IKA ボルテックスミキサーで 混合します。

オプション 2:4200 TapeStation または 2200 TapeStation 解析による確認

High Sensitivity D1000 ScreenTape (p/n 5067-5584)と試薬キット(p/n 5067-5585)を使用し、濃縮し たライブラリサンプルを解析します。

詳細については、TapeStation User Manual を参照して下さい。

または、TapeStation の和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。 <u>http://Agilentgenomics.jp</u>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

 User Manual に示されているように TapeStation のサンプルを調製します。解析のための新しいチューブストリップのウェル毎に 2 µL のライブラリサンプルをそれぞれ入れ、2 µL の High Sensitivity D1000 Sample Buffer で希釈します。

CAUTION 正確な定量のために、DNAとSample Bufferを混ぜたサンプルは、TapeStation付属のボルテックスミキサーでプロトコルに指定の時間、付属のボルテックスをお持ちでない場合、最高速度に設定して10秒x2回、確実に混合してください。

- 2 User Manual に示されているようにサンプルを含むチューブストリップ、High Sensitivity D1000 ScreenTape、およびローディングチップを TapeStation にセットします。サイズをより正確に計算す るために、キット付属のラダーも同時に泳動します。
- 3 各サンプルのエレクトロフェログラムを解析します。
 - エレクトロフェログラムで、およそ 225 から 540 bp の間に断片が分布していることを確認します。
 - エレクトロフェログラムの 175 bp から 625 bp のピークに対してインテグレーション機能を使って、各ライブラリプールの濃度を算出します。175 bp 以下のピークが観察される場合もありますが、定量には含めません。

High Sensitivity D1000 の定量範囲は 10 – 1000 pg/µL です。これよりも濃度が高い場合に は、LowTE で希釈して再度測定してください。

- デザインによっては 140 bp 付近に大きなピークが出ることがあります。140 bp のピークはアダ プターダイマーに由来し、クラスターは形成されるもののゲノムにマップできるシークエンスは 得られません。140 bp 付近のピークのモル濃度が全体の 10%以上になる場合は、サンプル をプールした後に再度 AMPure ビーズ精製を行います。
 - 1, 各サンプルで 175 -625 bp のピークの濃度を決定し、この濃度に従って等モルになるようにプールします。
 - 2, プールしたサンプルのうち 40 µL を使用して AMPure 精製を行います。





図 9 2200 TapeStation 解析での HaloPlex HS エンリッチメントの確認

STEP8. マルチプレックスシーケンシングのための異なるインデックスをもつサンプルのプ ール

次のガイドラインにしたがってサンプルプールの方法を決めてください。

- バイオアナライザまたは TapeStation を用いて、175-625 bp の範囲のサイズのライブラリを定量した濃度を用い、各サンプルを等モル濃度でプールすることでシーケンシングのキャパシティを最適化します。
- 完成した HaloPlex HS エンリッチメントプールは、標準的なイルミナペアエンドプライマーとケミストリ ーを使って、イルミナ HiSeq、MiSeq、NextSeq プラットフォームでのダイレクトシーケンシングに使 用できます。
 MiSeq プラットフォームをご使用の場合は、78-80 ページを参照し、Illumina Experiment Manager (IEM)を用いてランのセットアップを行ってください。
 HiSeq 、NextSeq プラットフォームをご使用の場合は、81 ページに記載のガイドラインを参照し、 装置のユーザーインターフェースを用いてランのセットアップを行ってください。また、下記のガイドラ インもご参照下さい。
- プローブデザインのときの選択に従い、100 + 100 bp または 150 + 150 bp ペアエンドシーケンシン グを使用してください。リード長は達成できる最大のカバレッジに影響するため、デザインレポートを 確認してプローブデザインで選択したリード長をご確認ください。
- Custom Index セッティングにて、シーケンスランのセッティングを行って下さい。サンプルインデックス(i7)は 8-nt インデックスリードで行われるように設定し、分子バーコード(i5)は 10-nt インデックスリードの設定が必要になります。インデックス配列の全情報については、86 ページ以降の表を参照してください。分子バーコード(i5)は全サンプル、NNNNNNNNN を入力して下さい。
- 得られたリードをリファレンスゲノムにアライメントする前に、イルミナのアダプター配列を取り除いて ください。Agilentの SureCall データ解析ソフトウェアにてこの作業を行う場合は、81ページをご覧く ださい。もし SureCall を使用しない場合、ターゲット DNA に含まれない read 2の最初の1ベースを マニュアルでトリミングする必要があります。
- 0.5%のアリル頻度を検出する場合、弊社では x2000-x4000 の読み取り深度でシークエンスすることを推奨しています。

プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、インデックスバーコ ードサンプルをプールするための量を計算します。

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): プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度 例:イルミナ標準プロトコルでは 10 nM
- # : プールするインデックスバーコードタグの数
- C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 33 に 4 つのインデックスタグ (それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。 最終的な容量 (この例では 20 μL、10 nM の濃度)にするには Low TE を用います。

表 33 トータル量 20µL にするためのインデックスタグ付きサンプルの混合例

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
1X Low TE Buffer					7.6

- 最終的に必要な液量になるように調製を行います。
 - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より少ない場合、Low TE Bufferを用いて総量が最終的に必要な液量になるように調整します。
 - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より多い場合、濃縮遠
 心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して最終的に必要な液量とします。
- template の変性とフローセルの調製に進みます。イルミナ社のプロトコルを参照してください。
- イルミナ Cluster Generation キット選択時の注意点
 MiSeq, HiSeq いずれの場合も、必要な Read length を確認し、Read1, Read2 に加えて 8 bp の Index read, 10 bp の molecular barcode read (計 18 bp) に十分な量の Sequencing 試薬があること を確認して下さい。

MiSeqプラットフォームシーケンシングランセットアップガイドライン

以下のガイドラインに従って、Illumina Experiment Manager (IEM)を用いてカスタムサンプルシートを 作成して下さい。一度サンプルシートを作成した後、マニュアルでインデックスの配列を HaloPlex HS イ ンデックス配列に変更する必要があります。HaloPlex HS システムのインデックス塩基配列情報につい ては、4. リファレンスの 86 ページ以降を参照して下さい。

カスタムサンプルシートの作成

- 1. IEM ソフトウェアを開き、下記のワークフローに従って MiSeq プラットフォーム用のサンプルシートを 作成します。
 - Select Category で、Other を選択します。
 - Select Application で、FASTQ Only を選択します。
- Workflow Parameters 画面で、下図スクリーンショットに従いパラメータを選択します。
 「Cycles Read 1」、「Cycles Read 2」の欄には、リード長が 150 bp のデザインの場合は 151、
 100 bp のデザインの場合は 101 と入力して下さい。

「FASTQ Only Workflow-Specific Settings」のチェックボックスは全て空欄にして下さい。特に、赤で 囲った「UseAdapter Trimming」、「UseAdapter Trimming Read 2」のチェックボックスはデフォルト ではチェックが入っているため、チェックを外して空欄になったことを確認して下さい。

ASTQ Only Run Settings		FASTQ Only Workflow-Specific Settings
Reagent Cartridge Barco	ode* MSXXXXXX300	Custom Primer for Read 1
Sample Prep Kit	TruSeq HT 🔹	Custom Primer for Index
Index Reads	© 0 © 1 © 2	Custom Primer for Read 2
		Reverse Complement
Experiment Name	Test Project	
Investigator Name	Test	Use Adapter Trimming
Description	10/ 7/2015 📴 🗸	Use Adapter Trimming Read 2
Read Type	Paired End O Single Read	
Cycles Read 1	151 😫	
	101	

3. Sample Sheet Wizard を使用して、各サンプルの情報を入力していきます。17 Sequence カラム には、Illumina の i7 インデックスのいずれかを割り当てます。インデックスは後のステップで HaloPlex HS インデックスに変更します。

同じように、I5 Sequence カラムにも Illumina i5 インデックスのいずれかを適当に割り当て、後のステップで分子バーコードとして入力内容を変更します。

imina experim	nent Manager								
mina E	Experime	nt Mar	nager						
		and Charlestern	-						1
Samn	le She	et W	izard	- Samn	le Sele	ction			
Jamp		UL VV	IZ-GI G	oump		CION			٦
Samples to inc	lude in sample shee	et							
Samples to inc	lude in sample shee	et							* - rec
Samples to inc Sample ID*	lude in sample shee Sample Name	Plate	Well	Index1 (17)*	17 Sequence	Index2 (15)*	15 Sequence	Sample Project	* - re
Samples to inc Sample ID* 1	lude in sample shee Sample Name	Plate Plate1	Well A01	Index1 (I7)*	17 Sequence ATTACTCG	Index2 (I5)* D501	I5 Sequence TATAGCCT	Sample Project	* - re Descriptio
Samples to inc Sample ID* 1 2	lude in sample shee Sample Name 1 2	et Plate Plate1 Plate1	Well A01 A02	Index1 (I7)* D701 D702	17 Sequence ATTACTCG TCCGGAGA	Index2 (I5)* D501 D501	15 Sequence TATAGCCT TATAGCCT	Sample Project	* - re Descriptio
Samples to inc Sample ID* 1 2 3	lude in sample shee Sample Name 1 2 3	et Plate Plate1 Plate1 Plate1 Plate1	Well A01 A02 A03	Index1 (17)* D701 D702 D703	17 Sequence ATTACTCG TCCGGAGA CGCTCATT	Index2 (I5)* D501 D501 D501	15 Sequence TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT	Sample Project	* - re Descriptio
Samples to inc Sample ID* 1 2 3 4	lude in sample shee Sample Name 1 2 3 4	Plate Plate1 Plate1 Plate1 Plate1 Plate1 Plate1	Well A01 A02 A03 A04	Index1 (17)* D701 D702 D703 D704	I7 Sequence ATTACTCG TCCGGAGA CGCTCATT GAGATTCC	Index2 (I5)* D501 D501 D501 D501 D501	I5 Sequence TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT	Sample Project	* - rei
Samples to inc Sample ID* 1 2 3 4 5	lude in sample shee Sample Name 1 2 3 4 5	et Plate Plate1 Plate1 Plate1 Plate1 Plate1 Plate1 Plate1	Well A01 A02 A03 A04 A05	Index1 ((7)* D701 D702 D703 D704 D705	17 Sequence ATTACTCG TCCGGAGA CGCTCATT GAGATTCC ATTCAGAA	Index2 (I5)* D501 D501 D501 D501 D501 D501	I5 Sequence TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT TATAGCCT	Sample Project	* - rec Descriptio

4. sample sheet セットアップタスクを終了し、sample sheet file を保存します。

HaloPlex HS インデックスと分子パーコードを含めるための Sample Sheet の編集

CAUTION このガイドには、2 種類の異なる 96 反応用インデックスプレートの情報が含まれてい ます。実験を進める前に、必ずお手元のキットのインデックスプレートの種類を確認 し、適切な配列情報を確認して下さい。 黄色プレートに入った 96 反応用インデックスプレートをご使用の場合は、86ページを 参照して下さい。 オレンジプレートに入った 96 反応用、または 48 反応用インデックスプレートをご使用 の場合は、87ページを参照して下さい。

- 1 Sample Sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、i7、i5 のインデックス情報 (下図でハイライトされた部分)を変更します。
- 5番目の I7_Index_ID カラムには、サンプルにアサインされた適切な HaloPlex HS のインデックス 名を入力します。6番目の index カラムには、サンプルごとの適切な HaloPlex HS 8 塩基のインデ ックス配列を入力します。
- 7 番目の I5_Index_ID カラムには、全てのサンプルに対して、「MoIBC」と入力します。8 番目の index2 カラムには分子バーコードとして、10 塩基の"NNNNNNNN"を入力します。

[Header]					1				
IEMFileVersion	4								
Investigator Name	Test								
Experiment Name	Test Project								
Date	10/8/2015								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Assay	HaloPlexHS								
Description	Test								
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
151									
151									
[Settings]									
ReverseComplemen	r 0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	17_Index_ID	index	15_Index_ID	index2	Sample_Project	Description
1	1	Plate1	A01	A01	ATGCCTAA	MolBC	NNNNNNNNN		
2	2	Plate1	A02	A02	AGCAGGAA	MolBC	NNNNNNNNN		
3	3	Plate1	A03	A03	ATCATTCC	MolBC	NNNNNNNNN		
-	-	and and a	004	LAP	MORACC.	man	-varan WADDEr		

2 編集した Sample Sheet ファイルを MiSeq でランを行うために適切な場所に保存します。

MiSeq Reporter の設定

初めて MiSeq にて HaloPlex HS ライブラリをランする際は、MiSeq Reporter の設定を、インデックス リードごとに FASTQ を出力する設定にして下さい。一度変更すると、その設定は保存されますので次の 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 を開いていただき、<appSettings>タグの下に、 <add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/> という一文を加えます。この変更を反映する ために、装置を再起動して下さい。実際の画面は以下のようになります。



NOTE

MiSeqDx プラットフォームをご使用の場合、MiSeq Reporter の設定を変更するため、装置を research モードに変更してご使用ください。もし、変更が可能でない装置の場合、dual boot configuration に対応したシステムへアップグレートが必要な可能性があります。

HiSeq または NextSeq プラットフォーム シーケンシングラン設定ガイドライン

シーケンシングランの設定を装置のコントロールソフトウェアの画面上で行って下さい。HiSeq プラットフォームで 100 + 100 bp ペアエンドのランを行う場合、下図のように設定します。150 + 150 bp ペアエンドシーケンス用でデザインした場合、Read1、Read2 のサイクル数を変更します。NextSeq を ご使用の場合、Run Setup スクリーンにて、下図の HiSeq プラットフォームの例と同じように設定してくだ さい。

RUN CONFIGURATION	PRE-RU	JN SETUP	INITIAT	E RUN			
Volume Check 🕨	Integration	Storage	Flow Cell	Setup 🕨	Advanced	Recipe)▶ Sample She
(c	heck rem:	aining para	ameters an	d select	NEXT to	continue	
l						oontinue.	
Index Type						Flow	Cell Format
O No Index		(Dual In	dex		0	Single Read
O Single Inde	ex		Custom			0	Paired End
Re	ead 1 In	dex 1 (i7)	Index 2 (i5)	Read	2		
Cycles: 100	8		10	100			
And and and a second se	harmon						man

データ解析リソース

Agilent の SureCall データ解析ソフトウェアを使用して、HaloPex HS を用いてターゲットエンリッチメント を行ったライブラリのシークエンスデータ解析を行うことができます。ソフトウェアは下記ウェブサイトより ダウンロード可能で、無償で使用できます。

www.agilent.com/genomics/surecall





この章では、キットの構成試薬とインデックス配列を含むリファレンス情報について説明します。

試薬一覧

HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントシステム試薬キットは-20°C 保存品です。 必ず指定温度で保管ください。

表 34 HaloPlex HS、ClearSeq Halo HS ターゲットエンリッチメントキット構成試薬一覧

Design Type	Reaction Number	HaloPlex HS Target Enrichment System-ILM (Store at –20°C)
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST	48 Reactions	5190-7835 OR 5190-7837 ^{†‡}
	96 Reactions	5190-7847 OR 5190-7849 [‡]
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM	48 Reactions	5190-7839 OR 5190-7841 [‡]
	96 Reactions	5190-7851 OR 5190-7853 [‡]
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM	48 Reactions	5190-7843 OR 5190-7845 [‡]
	96 Reactions	5190-7855 OR 5190-7857 [‡]
ClearSeq Cancer HS, ILM	96 Reactions	G9933B
ClearSeq Cardiomyopathy HS, ILM	96 Reactions	G9943B
ClearSeq ICCG HS, ILM	48 Reactions	5190-9182
	96 Reactions	5190-9200
ClearSeq Connective Disorder HS, ILM	48 Reactions	5190-9186
	96 Reactions	5190-9220
ClearSeq Arrhythmia HS, ILM	48 Reactions	5190-9180
	96 Reactions	5190-9198
ClearSeq Noonan Syndrome HS, ILM	48 Reactions	5190-9188
	96 Reactions	5190-9222
ClearSeq Chromosome X HS, ILM	48 Reactions	5190-9184
	96 Reactions	5190-9218

* 含まれる試薬については、表 36 を参照してください。

カスタムキット 48 反応も自動化実験にお使いいただけます。

* 各サイズのカスタムデザインで、初回オーダーの場合に 5190-7835, 5190-7847, 5190-7839, 5190-7851, 5190-7843, 5190-7855 がキットに含まれます。同一デザインの繰り返しオーダーの場合には 5190-7837, 5190-7849, 5190-7841, 5190-7853, 5190-7845, 5190-7857 となります。

4. リファレンス

HaloPlex HS Target Enrichment System Kit の構成試薬を下の表に示します。

Included Reagents	48 Reaction Kit	96 Reaction Kit
RE Buffer	tube with clear cap	bottle
BSA Solution	tube with clear cap	tube with clear cap
Enzyme Strip 1	8-well strip with green label	8-well strip with green label
Enzyme Strip 2	8-well strip with red label	8-well strip with red label
Enrichment Control DNA	tube with orange cap	tube with orange cap
Hybridization Solution	bottle	bottle
HS Hybridization Stop Solution	tube with clear cap	bottle
HS Ligation Solution	tube with black cap	tube with black cap
HS DNA Ligase	tube with green cap	tube with green cap
10 mM rATP	tube with clear cap	tube with clear cap
HS Wash 1 Solution	bottle	bottle
HS Wash 2 Solution	bottle	bottle
HS Capture Solution	bottle	bottle
HS Elution Buffer	bottle	bottle
Primer 1	tube with yellow cap	tube with yellow cap
Primer 2	tube with blue cap	tube with blue cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with clear cap	tube with clear cap
Herculase II Reaction Buffer	bottle	bottle
100 mM dNTP Mix	tube with clear cap	tube with clear cap
HaloPlex HS or ClearSeq HS Probe	tube with pink cap	tube with pink cap
HaloPlex HS Indexing Primers	Indexing Primers A01 to H06 in orange 96-well plate	Indexing Primers A01to H12 in orange 96-well plate [†]

表 35 HaloPlex HS Target Enrichment System Kit

*表 36 のプレートマップを参照してください。

† 表 37 のプレートマップを参照してください。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	A01	A02	A03	A04	A05	A06	_	_	_	_	_	_
в	B01	B02	B03	B04	B05	B06	_	_	_	_	_	_
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	_	_	_	_	_	_
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	_	_	_	_	_	_
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	_	_	_	_	_	_
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	_	_	_	_	_	_
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	_	_	_	_	-	-
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	_	_	_	_	_	_

表 36 HaloPlex HS Indexing Primer Cassette A01 から H06 のプレートマップ: 48 反応キット、7-12 列は空ウェル

表 37	HaloPlex HS Indexing Primer	Cassette A01 から H12	のプレートマップ: 96 反応キット
------	-----------------------------	---------------------	--------------------

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
В	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

4. リファレンス

HaloPlex HS Index の塩基配列

各 HaloPlex HS Index Primer Cassette の8 ヌクレオチドのインデックス部分の塩基配列を以下の表に 示します。48 反応キットには、A01 から H06 の 48 種類のプライマーカセットが入ったプレートが含まれ ます。96 反応キットには、A01 から H12 の 96 種類のプライマーカセットが入ったプレートが含まれます。 96 反応キットをご使用の場合、インデックスプライマープレートの色を基に、適切な塩基配列表を参照し ていることを確認して下さい。黄色プレートの場合は表 38 を、オレンジ色プレートの場合は表 39 を参照 して下さい。黄色プレートとオレンジプレートはインデックス F09 の配列のみが異なります。

Index	Sequence	Index	Sequence		Index	Sequence	Index	Sequence
A01	ATGCCTAA	A04	AACTCACC		A07	ACGTATCA	A10	AATGTTGC
B01	GAATCTGA	B04	GCTAACGA		B07	GTCTGTCA	B10	TGAAGAGA
C01	AACGTGAT	C04	CAGATCTG		C07	CTAAGGTC	C10	AGATCGCA
D01	CACTTCGA	D04	ATCCTGTA		D07	CGACACAC	D10	AAGAGATC
E01	GCCAAGAC	E04	CTGTAGCC		E07	CCGTGAGA	E10	CAACCACA
F01	GACTAGTA	F04	GCTCGGTA		F07	GTGTTCTA	F10	TGGAACAA
G01	ATTGGCTC	G04	ACACGACC		G07	CAATGGAA	G10	CCTCTATC
H01	GATGAATC	H04	AGTCACTA		H07	AGCACCTC	H10	ACAGATTC
A02	AGCAGGAA	A05	AACGCTTA	ĺ	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA		B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT		C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	ĺ	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	ĺ	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	ĺ	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	ĺ	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	ĺ	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	ĺ	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	ĺ	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	ĺ	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	ĺ	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA	E06	ATTGAGGA	ĺ	E09	AGATGTAC	E12	ACACAGAA
F03	GCGAGTAA	F06	GTCGTAGA		F09	TGACCGAT	F12	GAACAGGC
G03	ACTATGCA	G06	AGAGTCAA		G09	CCGAAGTA	G12	AACCGAGA
H03	CGGATTGC	H06	CCGACAAC		H09	CGCATACA	H12	ACAAGCTA

表 38 黄色プレートの HaloPlex HS インデックス配列

4. リファレンス

Index	Sequence	l	ndex	Sequence		Index	Sequence	Index	Sequence
A01	ATGCCTAA		A04	AACTCACC		A07	ACGTATCA	A10	AATGTTGC
B01	GAATCTGA	Í	B04	GCTAACGA	Ì	B07	GTCTGTCA	B10	TGAAGAGA
C01	AACGTGAT		C04	CAGATCTG	Ì	C07	CTAAGGTC	C10	AGATCGCA
D01	CACTTCGA		D04	ATCCTGTA	Ì	D07	CGACACAC	D10	AAGAGATC
E01	GCCAAGAC	Í	E04	CTGTAGCC	ĺ	E07	CCGTGAGA	E10	CAACCACA
F01	GACTAGTA	Í	F04	GCTCGGTA	Ì	F07	GTGTTCTA	F10	TGGAACAA
G01	ATTGGCTC		G04	ACACGACC		G07	CAATGGAA	G10	CCTCTATC
H01	GATGAATC	Í	H04	AGTCACTA	ĺ	H07	AGCACCTC	H10	ACAGATTC
A02	AGCAGGAA		A05	AACGCTTA	Ì	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	Í	B05	GGAGAACA	Ì	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	Í	C05	CATCAAGT	Ì	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC		D05	AAGGTACA	ĺ	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	Í	E05	CGCTGATC	ĺ	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	Í	F05	GGTGCGAA	ĺ	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	Í	G05	CCTAATCC	Ì	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC		H05	CTGAGCCA	ĺ	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC		A06	AGCCATGC	Ì	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA		B06	GTACGCAA	Ì	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	Í	C06	AGTACAAG	ĺ	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	Í	D06	ACATTGGC	Ì	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA		E06	ATTGAGGA		E09	AGATGTAC	E12	ACACAGAA
F03	GCGAGTAA		F06	GTCGTAGA		F09	TCTTCACA	F12	GAACAGGC
G03	ACTATGCA		G06	AGAGTCAA		G09	CCGAAGTA	G12	AACCGAGA
H03	CGGATTGC		H06	CCGACAAC		H09	CGCATACA	H12	ACAAGCTA

表 39 オレンジプレートの HaloPlex HSIndex 配列



5. Appendix

FFPE 由来 DNA サンプルを用いる時のプロトコル改変 89 アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル 91

「FFPE 由来 DNA サンプルを用いるときのプロトコル改変」では、Agilent NGS FFPE QC キットを用いて 測定した値に基づくプロトコルのマイナーな改変について記載します。

「アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル」では、デザインによっては必要となる、140 bp のアダプターダイマー除去のための AMPure XP ビーズを用いたライブラリプールの精製方法につい て説明しています。このステップは、エンリッチメント後のライブラリをバイオアナライザまたは TapeStation で分析した際に、140 bp のピークのモル濃度が全体の 10%を超えた場合にのみ実施しま す。

FFPE 由来 DNA サンプルを用いるときのプロトコル改変

Agilent NGS FFPE キットは qPCR を用いた DNA サンプルの分解度を測定するためのキットです。こ れにより、サンプル中の増幅可能な DNA の正確な量と ΔΔCq 値(DNA の分解度のスコア)を算出するこ とができます。ここでは、ΔΔCq 値に基づく HaloPlex HS プロトコルの改変について記します。

NOTE SureDesign で FFPE 由来サンプルをシーケンスするための新しい HaloPlex HS プローブを設計する際には、「Tile Genes or Regions」画面で Optimize for FFPE samples チェックボックスを選んで下さい。このオプションを選ぶためには、デザイン の作成を開始する際に Show Advanced Design Options を選ぶ必要がありま す。 HaloPlex HS プロトコルの改変と推奨シーケンス量は FFPE オプションを使用した場 合でも、使用していない場合でも適用可能です。

HaloPlex HS プロトコルの改変

Agilent NGS FFPE QC キットを用いて、それぞれの FFPE DNA サンプルの ΔΔCq 値と増幅可能な DNA 量を算出します。 Agilent NGS FFPE QC キットのプロトコルを参照して下さい。

各サンプルについて ΔΔCq 値を算出したのち、必要であれば表 40 に従って DNA インプット量を調整し ます。

表 40 ΔΔCq 値に基づく HaloPlex HS プロトコルの改変

Protocol Step and Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		∆∆Cq≤1.3	$\Delta\Delta Cq$ between 1.3 and 1.5	$\Delta\Delta$ Cq between 1.5 and 2.5 [*]
DNA input for Library Preparation	50 ng, based on Qubit Assay	50 ng, based on Qubit Assay	50 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification	100 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification

* $\Delta\Delta Cq$ 値が 2.5 以上の FFPE サンプルは HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントの結果やシーケン ス結果に影響が出る場合があります。 $\Delta\Delta Cq$ 値が 2.5 以上の FFPE サンプルを用いる場合は、 $\Delta\Delta Cq$ between 1.5 and 2.5 と同じプロトコル改変を行ってください。

5. Appendix

推奨シーケンス量

FFPE DNA サンプルに対する推奨シーケンス量を決定します。

- 1. 使用するプローブ HaloPlex Design report 中の Total Sequenceable Design Size を参照します。
- 2. 表 41 のガイドラインを用いて、△△Cq 値に基づく HaloPlex HS で濃縮した FFPE サンプルの推奨 シーケンス量を決定します。

表 41 FFPE 由来 DNA サンプルに対する推奨シーケンス量

$\Delta\Delta$ Cq value	Recommended amount sequencing output for FFPE-derived sample
≤1.3	300–600× Total Sequenceable Design Size
between 1.3 and 1.5	600–1200× Total Sequenceable Design Size
between 1.5 and 2.5^*	1200× Total Sequenceable Design Size

* $\Delta\Delta Cq$ 値が 2.5 以上の FFPE サンプルは HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントの結果やシーケン ス結果に影響が出る場合があります。 $\Delta\Delta Cq$ 値が 2.5 以上の FFPE サンプルを用いる場合は、 $\Delta\Delta Cq$ between 1.5 and 2.5 と同じプロトコル改変を行ってください。

NOTE	FFPE 由来でないサンプルの一般的なシーケンス量のガイドラインは Total
	Sequenceable Design Size の約 200x です。

例えば、Total Sequenceable Design Size が 1 Mb であり、FFPE サンプルの $\Delta\Delta$ Cq 値が 1.4 であった場合、インタクトな DNA サンプルでシーケンス量 200 Mb の時に期待されるカバレッジと同等のカバレッジを得るためには、600 - 1200 Mb のシーケンス量が必要です。

アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル

このステップは、140 bp のアダプターダイマーピークがモル濃度で 10%を超える場合にのみ実施します。 ライブラリを適切な組み合わせで等モルずつプールし、そのうち 40 µL を AMPure XP ビーズを使用して 精製します。

NOTE このプロトコルでは 0.2 ml チューブで使用可能なマグネットプレート(Agencourt SPRIPlate Super Magnet Plate, Agencourt p/n A32782 など)が必要となります。

- 1 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XPビーズ (4°C 保存)を室温に戻しておくようにします
- 2 1 サンプルあたり400 µL(+余剰分)の70%エタノールを調製します。step 10 で使用します。
- 3 バイオアナライザまたは TapeStation で測定した濃度に基づき、適切な数のライブラリを等モルず つプールします。各ライブラリプール 40 µL を新しい 0.2 mL チューブに移します。各サンプルの残り は-20°C で保存します。
- 4 AMPure ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- 5 別のチューブに、1 サンプルあたり、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 100 µL と、 Nuclease-free 水 40 uL の混合液を作り、均一な状態になるまでよく混ぜます。
- 6 前ステップで調製した AMPure XPビーズと Nuclease-free 水の混合液 140 uL を、PCR 反応サン プル 40 µL が入ったチューブに加えます。チューブにキャップをして Vortex でよく攪拌します。この ビーズとサンプル量の比は、最適な精製結果を得るために重要です。
- 7 室温で5分間インキュベートします。このインキュベーションの間は、溶液の撹拌を続けるようにして ください。

5分間のインキュベーションの間、サンプルが撹拌されていることを確認して下さい。

- 8 チューブをスピンダウンして溶液を集めてから、マグネットプレートにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約5分間)
- 9 チューブをマグネットプレートにセットしたまま、200 µL ピペットを 180 µL にセットしたものを使用し、 ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。
- 10 チューブをマグネットプレートにセットしたまま、70%エタノール溶液をチューブに 200 µL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールは用時調製します。
- 11 溶液が透明になるまで、そのまま 30 秒間静置します。その後、200 µL ピペットを 200 µL にセットしたものを使用し、ビーズを吸い込まないように注意してエタノールを取り除きます。
- 12 10と11のステップをもう一度繰り返します。(計2回の洗浄)
- 13 20 µL 容量のピペットで残存エタノールを取り除きます。

5. Appendix

- 14 チューブの蓋を開け、室温で残存エタノールが完全に蒸発するまで風乾します。 次のステップに進む前にエタノールが完全になくなったことを確認してください。
- 15 マグネットプレートからチューブを取り出し、サンプルに 40 µL の HS Elution Buffer を加えます。

NOTE サンプルの溶出には、室温の HS Elution Buffer を使用します。

- 16 100 µL ピペットを 30 µL にセットしたものを使用し、15 回のピペッティングで完全に混ぜます。
- 17 室温で2 分間インキュベートして DNA を溶出させます。
- 18 チューブをマグネットプレートにセットして、2 分間静置すると溶液が透明になります。この状態で、 精製された DNA は溶液のほうに移っています。
- 19 上澄み(約 40 µL)を新しいチューブに移します。この液には精製された DNA が移っているので、液 を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは-20°C で長期保存(1 年まで)で Stopping Point きます。保存した DNA は、凍結融解を繰り返さないようにしてください。 Copyright Agilent Technologies 2015

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、 翻訳することは禁止されています。

本和文プロトコルの版権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、

お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザーの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本プロトコル以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

本書の内容の一部または全部を無断で複写、転載したり、他の言語に翻訳したりすることは法律で禁止 されています。複写、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル、CD-ROM 等の媒体は本製品用にだけお使いください。

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品 性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

HaloPlex HS に関するサポートお問い合わせ窓口

Tel: 0120-477-111

E-mail: email japan@agilent.com

* HaloPlex HS に関するテクニカルな質問と明示ください。

*価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。