HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントシステムプロトコル 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 C.1　対応
［2017 年 01 月版　和文］

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

Protocol
HaloPlex HS Target Enrichment System for Illumina Sequencing
for Illumina Sequencing
Version C1, Decemeber 2016
G9931-90000

に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント HaloPlex HS Target Enrichment System 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操作手順を記述しています。

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

1. はじめに

この章では、実験をはじ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. サンプル調製

この章では、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。

3. Appendix：FFPE 由来の DNA サンプル使用について

この章では、FFPE 由来の DNA サンプル使用した際に最適な結果を得るための情報について説明しています。

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。

これまでのバージョンでの変更点

Ver C 1 での変更点（2017 年 1 月）

・エタノールの蒸発ステップの待ち時間の表記のアップデートと、ビーズの乾燥のし過ぎを避ける内容の注意のアップデート（p.33, Step 12）。

・AMPure XP ビーズにサンプルを結合させている5分間のインキュベーション時間の間に、ライゲーション試薬の準備の推奨のアップデート（p.32, Step 5）

・エタノールの蒸発ステップの待ち時間の表記のアップデート（p.40, Step 13）

・Thermo Fisher Scentific 社から購入する試薬・装置・消耗品の製造メーカ名のアップデート（p.9, 10, 11）。

Ver C 0 での変更点（2016 年 03 月）

・ClearSeq AML Halo HS kit に対応しました。（8 ページ表 1 をご確認ください）

・FFPE 由来の DNA サンプルに対応しました。53 ページ Appendix: FFPE 由来の DNA サンプル使用について と 16 ページの Note をご確認下さい。

・NextSeq 500 プラットフォームに対応し、全てのプラットフォームに関して Library 調製後ガイトラインの記載がアップデートされました。（49-52 ページ）

・2 種類の 96 反応用インデックスプレートに対応しました。黄色のインデックスプレート付属のキットは、F09 インデックスプライマーのインデックス配列に変更があります。（58 ページ、表 17 をご参照下さい。）オレンジのインデックスプレート付属のキットは、変更前の F09 インデックスプライマーが含まれています。（59 ページ、表 18 をご参照下さい。）

・14 ページに、”DNA サンプルの品質とスタート量の検討”という項目が加わりました。

・16 ページの DNA サンプル調製のフォーマットがアップデートされました。

・55 ページ、 表 13 の情報がアップデートされました。

・27 ページ、 表 5 に ClearSeq HS Probes の記述が加わりました。

・31 ページ、HS Ligation Solution の融解条件が修正されました。

・42 ページ、期待される結果のアンプリコンのサイズの記載が 190-640 bp に修正されました。

・4200 TapeStation に対応しました。実験に必要な物リストに、4200 TapeStation が加わりました。（11 ページ、表 3）

目次

1. はじめに

実験を始める前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

HaloPlex HS Target Enrichment Kit 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。

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 キットには対応していませんのでご注意下さい。

- HaloPlex HS プロトコルでは 50 ng とピペッティングロスを見込んだ余剰分をプラスしたゲノム DNA（gDNA, 8 組の制限酵素反応用に分注）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 gDNA 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 gDNA 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。

- PCR 増幅前と PCR 増幅後の DNA サンプルは常に離れた作業場所に置くようにしてください。STEP6. キャプチャしたターゲット DNA の PCR 増幅 のセットアップまでの作業は「増幅前」の作業場所で行ってください。STEP7. 増幅したターゲットライブラリの精製 で増幅したライブラリの精製以降は、「増幅後」の作業場所でのみキャップを開けるようにしてください。

- 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されていることを確認してください。

- Biosafety Level 1 (BL1) のルールに基づき、実験を行います。

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 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　1　実験に必要な試薬

＜必要な試薬類＞

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量/1反応あたり	内容量	備考
HaloPlex HS 試薬キット						
HaloPlex HS カスタムパネル（分子バーコード対応） 以下から選択してください						
HaloPlex HS カスタム 1 kb -500 kb, プローブ数<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
HaloPlex HS カスタム 1 kb -500 kb, プローブ数<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（分子バーコード対応） 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 , 96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。						

その他の試薬						
Agencourt AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter Genomics	A63880 または A63881	指定	180 uL	A63880 - 5 mL x1, A63881 - 60 mLx1	
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850 または Q32853	指定		Q32850 - 100 assays, Q32853 - 500 assays	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当		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				0.8 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)				10 uL		10Mのストック溶液から用時調製
10 mM Tris-HCl, pH8.5						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
Low TE buffer (10mM Tris-HCL 0.1mM EDTA, pH 8.0)						分子生物学実験用グレード, 一般的なもので可
〈 オプション 〉						
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)			16反応分 または96反応分	FFPE 由来DNAサンプルを使用する際のゲノムDNA QCに使用

各キットには、Enrichment Control DNA (ECD) の反応分も含めて 16 反応分、48 反応分または 96 反応分の試薬が含まれます。

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

アジレント製品の保証期間は、箱やチューブの入った小袋あるいはボトルに記載の Expiration date (Exp. Date) までです。保証期間を過ぎた製品については欠品等があった場合も交換ができない場合がありますので、製品が納品されたらすぐに内容物を確認して下さい。

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するように計画して下さい。

※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。

1. はじめに

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

＜必要な機器、消耗品類＞

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	内容量	備考
Agilent SureCycler 8800	Agilent	G8800A（本体） G8810A（96 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
Compression Mat	Agilent	410187				サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
Adhesive seal	Agilent	410186	相当	Seal 2枚	100 枚	96ウェルプレート用の粘着シール、サーマルサイクラーおよびプレートにあわせて選択
8-well strip tube	Agilent	410092	相当		120本	サンプル数、サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
8-well strip cap	Agilent	410096	相当		120本	サンプル数、サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
12-well strip tube	Agilent	410082	相当		80本	サンプル数、サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
12-well strip cap	Agilent	410086	相当		80本	サンプル数、サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
DynaMag-96 Side maget (96ウェルプレート用) または日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	Thermo Fisher Scientific または 日本ジェネティクス	96ウェルプレート用 12331D, 8連チューブ用 FG-SSMAG2	相当	1		8連チューブで実験する場合、8連チューブが独立で固定できるもの (日本ジェネティクス FG-SSMAG2)
Qubit 2.0 fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q32866	推奨			スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit assay tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
Dynal DynaMag-2	Thermo Fisher Scientific	123-21D	相当			1.5 - 2mL 遠心チューブ 16本立ての磁気ビーズ用磁石スタンド、ビーズのウォッシュに使用
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,P1000	相当			
マルチチャンネルピペット	Eppendorf	0.5 - 10 uL, 10 - 100 uL	相当			ハイブリダイゼーションの準備、ビーズ精製などで使用します
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						
MS3 digital	IKA	3319000	相当			8連チューブ/96wellプレートをセットでき、1300rpm設定できるタイプの　ボルテックスミキサー
MS3.5 PCR プレート用　アタッチメント	IKA	3428000	相当			

＊サーマルサイクラーは最大反応量が 100 µL 以上に設定でき、

0.2 mL tubes に対応したタイプをご使用下さい。

サンプル QC に使用する装置、消耗品類

表 3 サンプル QC に使用する装置、消耗品類

＜サンプル QC のために以下 2 オプションのうちから1つを選んでご準備いただく装置・消耗品 ＞

品名	製造メーカー	品番	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	2ラン	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。エキスパートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です
オプション2 TapeStation 4200 または 2200 による測定						
2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA または G2965AA	指定			DNAの定性または定量に使用することができます。
4200 TapeStation System	Agilent	G2991AA	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	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	指定	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、ア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	Thermo Fisher Scientific	EI0001	指定			
Novex 6% Polyacrylamide, TBE Pre-cast Gels	Thermo Fisher Scientific	EC62655BOX	指定	1ラン		
Novex TBE Running Buffer, 5x	Thermo Fisher Scientific	LC6675	指定			
Novex High-density TBE Aample Buffer, 5X	Thermo Fisher Scientific	LC6678	指定			
GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water	Biotium	41001	指定			
DNA molecular weight markers						一般的なもので可
UV-transilluminator						一般的なもので可

＊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

2. サンプル調製

この章では、アジレントの 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。

ターゲット領域は 1 kb-5 Mb の範囲となります。カスタム HaloPlex HS デザインの場合は、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 Target Enrichment System 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。ハイブリ中に取り込まれるインデックスプライマーカセットには、分子バーコード配列も含まれ、シーケンス解析の際に、各リードがどのアンプリコン由来であるかを追跡することができます。

HaloPlex HS を用いた操作の概略は図 1 をご覧ください。

プロトコルの流れ

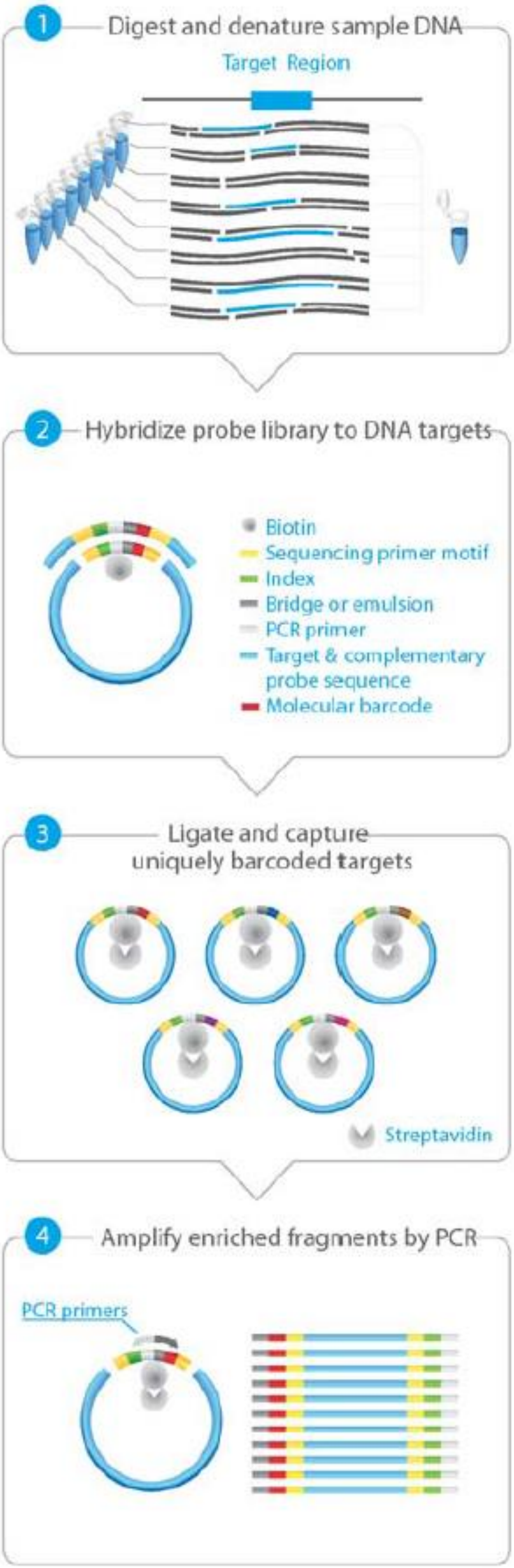


図 1 サンプル調製ワークフロー

2. サンプル調製

DNA サンプルの品質確認とスタート量の検討

ターゲットエンリッチメントを成功させるためには、高品質で、正確に定量された gDNA サンプルが必要です。実験には、OD260/280 の比が 1.8-2.0 の間にある高品質の gDNA を使用してください。ゲル電気泳動で各 gDNA 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。
標準的な DNA サンプル（FFPE 由来ではないサンプル）では、できるだけ正確に gDNA を定量するために、Qubit 蛍光測定法や PicoGreen 染色法のような蛍光による DNA 定量法を用いてください。

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
1.8 ng/µL x 32 µL = 57.6 ng の gDNA を 8 ウェルに分注し、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、頻度の低いアリルが検出されないことがあります。

FFPE サンプルからのターゲットエンリッチメント
本プロトコルは gDNA の品質によって必要なスタート量を調整することで、FFPE から抽出した DNA サンプルにも対応しています。実験を始める前に 53 ページの Appendix を参照し、必要なスタート gDNA（50 ng 或いは 100 ng）を検討して下さい。また蛍光測定法、または qPCR、どちらの定量値を用いてスタート量を計算するかを決定します。

1 回あたりのサンプル数の検討

キットには、Enrichment Control DNA (ECD)の反応も含めて 16 反応、48 反応もしくは 96 反応分の試薬が含まれます。1 回の実験には ECD Control を 1 反応含める必要があります。ECD はキットに含まれています。

本プロトコルは、1 回の実験あたり 12 サンプル（11 gDNA サンプル + 1 ECD サンプル）、あるいは 12 の倍数のサンプル数を調製するように構成されています。本プロトコルでは 1 回あたり 12 サンプルで実験する場合の試薬量が記載されています。1 回あたりのサンプル数を 12 から増減させる場合には、試薬の量を増減してください。Restriction Enzyme マスターミックスについては 2 反応分を余剰分 として追加し、そのほかの各マスターミックスは 1 反応分を余剰分として追加して計算します。たとえば、 16 サンプルの場合は、Restriction Enzyme マスターミックスの調製時には 1 反応分の 18 倍で計算し、ハイブリダイゼーション以降のステップで用いる各マスターミックスの調製時には 1 反応分の 17 倍で計算します。

96 反応キットは 12 サンプルずつ 8 回、計 96 サンプルを処理するためのマスターミックスを調製するのに十分な試薬を含んでいますが、1 回あたり 12 サンプルより少ない数でサンプルを処理していくと、 一部の試薬が足りなくなり、96 サンプルを処理できませんのでご注意ください。

48 反応キットは 12 サンプルずつ 4 回、計 48 サンプルを処理するためのマスターミックスを調製するのに十分な試薬を含んでいますが、1 回あたり 12 サンプルより少ない数でサンプルを処理していくと、 一部の試薬が足りなくなり、48 サンプルを処理できませんのでご注意ください。

16 反応キットは 1 回で 16 サンプルを処理するためのマスターミックスを調製するのに十分な試薬を含んでいます。1 回あたり 16 サンプルより少ない数でサンプルを処理していくと、一部の試薬が足りなくなり、16 サンプルを処理できませんのでご注意ください。

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付属する 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（図 1 参照）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。制限酵素処理を午後から開始し、ハイブリダイゼーションをオーバーナイトで行うことができます。

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。
50 ng + ピペットロス分を加えた gDNA は 8 種類の制限酵素反応液に分注されます。

本プロトコルでは 12 サンプルの調製に対応した容量を記載していますが、96 サンプルまでスケールアップすることが可能です。1 回の実験あたり、ECD control を 1 サンプル含める必要があります。試薬量の計算は 14 ページの “1 回あたりのサンプル数の検討” も参照してください。

1 Qubit dsDNA BR Assay キットまたは PicoGreen 染色キットを用いて、gDNA サンプルの濃度を正確に測定します。それぞれのキットのマニュアルに従ってください。

NOTE FFPE 由来のサンプルでは、Agilent qPCR-based NGS FFPE QC Kit を用いてサンプルごとの DNA 品質を把握し、その結果を基に、増幅可能な gDNA の濃度を決定して下さい。

2 gDNA サンプルを調整します。1 回あたり 12 サンプル調整する場合は、gDNA サンプルを 11 サンプルと ECD を 1 サンプル準備します。

a 各 gDNA サンプル 58 ng を、最終濃度が 1.8 ng/μL となるように 10 mM Tris buffer (pH 8.5) で調整します。

b 0.2 mL の PCR チューブに、step a で調整した各 11 サンプルを 32 μL ずつ分注します。8 連チューブを使用すると後のステップでの分注に便利です。氷上に置きます。

NOTE FFPE 由来のサンプルでは、53 ページのガイドラインを参照し、最適な gDNA スタート量と、最適な濃度測定方法を決定します。FFPE 由来のサンプルで 100 ng スタートとなった場合、このステップでは、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で 3.6 ng/μL に希釈した gDNA から、32 μL 使用します。

c サンプル DNA と同じ 8 連チューブの別のウェルにキット付属の Enrichment Control DNA (ECD) を 32 μL 分注します。20 ページ、step5 で使用するまで氷上に置きます。

3 Restriction Enzyme Master Mix Strip を調製します。

gDNA の消化は、各 2 種類の制限酵素を含む、8 種類の異なる制限酵素反応で行われます。**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製します。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。図 2 は 18 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、12 サンプルの場合の例を示しています。

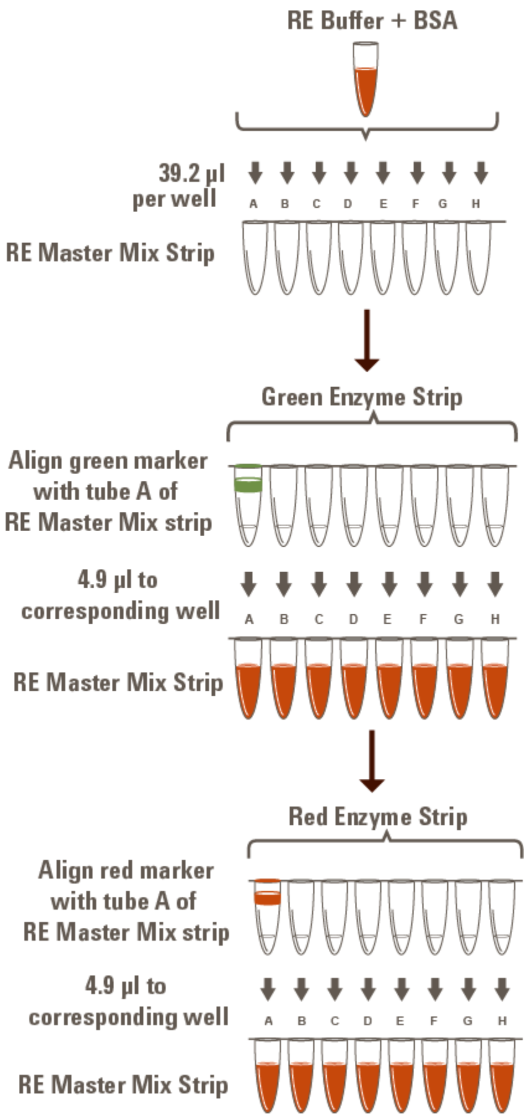


図 2 Restriction Enzyme マスターミックス Strip の調製（12 サンプルの例）

2. サンプル調製

a 表に記載の容量の RE Buffer と BSA Solution を 1.5 mL チューブに入れ、混ぜます。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
RE Buffer	24.6 µl	344 µl
BSA Solution	0.64 µl	9 µl
Total Volume	**25.2 µl**	**353 µl**

b a で調製した RE Buffer/BSA 混合液を新しい 8 連ストリップチューブの A から H の各ウェルに、サンプル (Reaction) 数に応じた容量を分注します。以下、このストリップチューブを RE (Restriction Enzyme) マスターミックス Strip と呼びます。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。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
RE Buffer/BSA mixture	2.8 µl	39.2 µl

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。Restriction 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。

c Green Enzyme Strip の緑色のマーカーを RE マスターミックス Strip の A にあわせ、A から H のチューブから各酵素を RE マスターミックス Strip の対応する A から H のチューブに、 マルチチャンネルピペットを使ってサンプル (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。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
RE Enzymes from Green Enzyme Strip	0.35 µl	4.9 µl

d Red Enzyme Strip の赤色のマーカーを RE マスターミックス Strip の A にあわせ、A から H のチューブから各酵素を RE マスターミックス Strip の対応する A から H のチューブに、マルチチャネルピペットを使ってサンプル (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。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
RE Enzymes from Red Enzyme Strip	0.35 µl	4.9 µl

e　チューブにキャップをして、穏やかなボルテックスで混合し、スピンダウンします。

f　step 4 で使用するまで RE マスターミックス Strip は氷上に置きます。

4　RE マスターミックスを Restriction Digestion Reaction Plate として使用する 96 ウェルプレートに分注します。12 サンプルの場合は 1 枚、13 サンプル以上の場合は 2 枚以上のプレートを使用します。

a　step 3 で調製した RE マスターミックス Strip を下図に示すように **8 連チューブの A と 96 ウェル PCR プレートの A 行が揃うように**、プレートの縦方向にそって並べるように置きます。

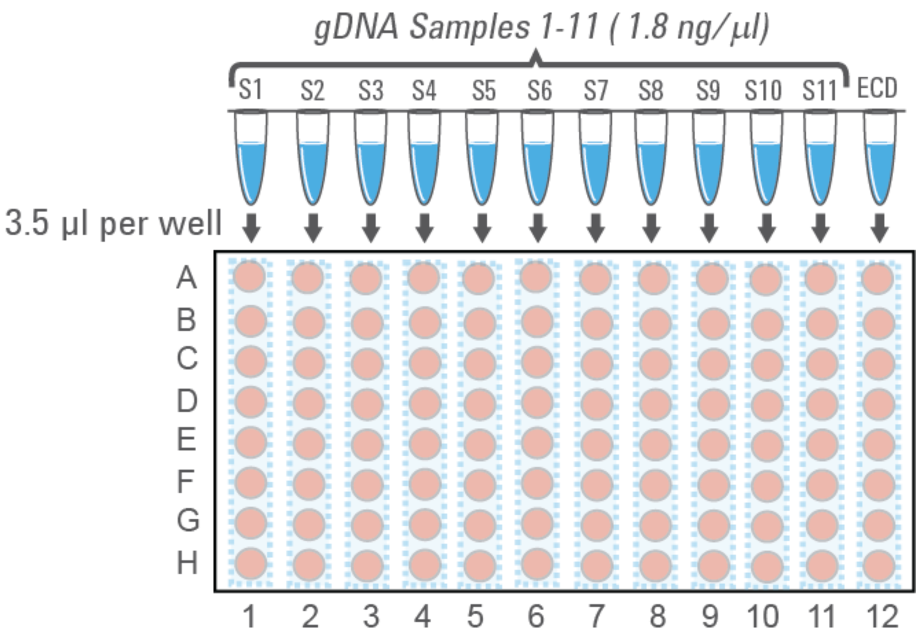
b　マルチチャンネルピペットを使い、3.5 µL の RE マスターミックスを Restriction Digestion Reaction Plate の各ウェルに、1-12 の方向に注意して分注します。A のチューブがウェル　プレートの A の位置に来る向きで分注するように注意してください。

1 回あたり 13 サンプル以上で実験する場合は、1 枚目のプレートの 1-12 に分注した後に、　2 枚目のプレートに分注していきます。

プレートに液を分注する時には、ピペットチップに液が等量吸われていることを目視で確認してください。 ここまでの操作で、96　ウェルプレートの各行には同じ制限酵素の組み合わせが 1 ウェルあたり 3.5 µL 含まれることになります。

5 DNA サンプルを 96 ウェルの Restriction Digestion Reaction Plate に分注します。

a step 2 で調整した 12 DNA サンプル（11 gDNA サンプルと Enrichment Control DNA サンプル）を、下図に示すように Restriction Digestion Reaction Plate に対して横方向に並べます。



b 3.5 µL の gDNA サンプルを Restriction Digestion Reaction Plate の各ウェルに、A-H の方向に分注します。このように分注することで、各サンプルが正しい組み合わせの 8 組の制限酵素によって断片化されます。

マルチチャンネルピペットを使う場合、プレートに液を入れる時に、ピペットチップに液が等量吸われていることを目視で確認してください。

DNA サンプルをそれぞれの制限酵素反応ミックスに分注したら、コンタミネーションを防ぐため、必ずピペットチップを交換します。

c 粘着性のプラスチックフィルムでプレートを確実にシールしてください。

6 プレートを注意してボルテックスし、反応液を混ぜます。

7 プレート遠心機でスピンダウンします。

調製した 96 ウェルプレートには、7 µL の制限酵素反応液が含まれています。このフォーマットでは、プレートの各列に含まれる、同一の gDNA に由来するそれぞれのサンプルが 8 種類の異なる制限酵素反応液中で消化されることになります。

8 Restriction Digestion Reaction Plate をサーマルサイクラーにセットし、表 4 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。

表 4 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

NOTE

この段階では 1 種類の gDNA サンプルに由来する 8 種類の制限酵素消化物をプールしないでください。制限酵素にはまだ活性があり、酵素を失活させる前に DNA サンプルをプールすると不適切な切断が起きてしまいます。DNA サンプルは 27 ページのハイブリダイゼーションステップで、1 種類の制限酵素のウェルごとにハイブリダイゼーションマスターミックスに直接移して混合して行きます。制限酵素はハイブリダイゼーションマスターミックスと混合されることで失活します。

9 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。

a Restriction Digestion Reaction Plate を軽くスピンダウンし、制限酵素処理を行った DNA をウェルの底に集めます。

b Restriction Digestion Reaction Plate の ECD を反応させた該当箇所のウェルから 4 µL ずつ計 8 つの反応液をとり、新しい 8 連 PCR チューブの A-H に移します。

c 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を用いて 80°C で 5 分間加熱し、制限酵素を失活させます。

d 2100 バイオアナライザ（23 ページ参照）、4200 TapeStation または 2200 TapeStation（24 ページ参照）、またはゲル電気泳動（26 ページ参照）で、調製した ECD サンプルを分析します。

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 3、図 4、 図 5 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。

http://Agilentgenomics.jp

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。

1 新しいチューブに 1 µL の Enrichment Control DNA ストック溶液と 1 µL 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ー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 2 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 3 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。

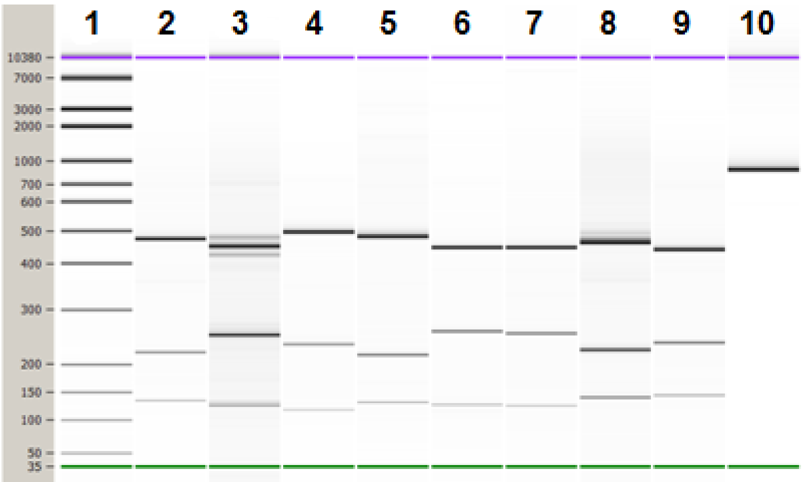


図 3 2100 バイオアナライザ解析による制限酵素処理の確認。左から DNA ladder、レーン 2-9: ECD 切断反応液 A-H、レーン 10：未消化 Enrichment Control DNA

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、39 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

2. サンプル調製

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

High Sensitivity D1000 ScreenTape と試薬キットを使用します。
詳細については、*4200 TapeStation User Manual* または *2200 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。
http://Agilentgenomics.jp
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 1 µL の Enrichment Control DNA ストック溶液と 1 µL 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。

4200 TapeStation または *2200 TapeStation 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 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 付属ボルテックス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は最高速度に設定して 10 秒 x2 回、確実に混合してください。

1 *4200 TapeStation* または *2200 TapeStation 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装置にセットします。図 4 に TapeStation 電気泳動結果の例を示します。

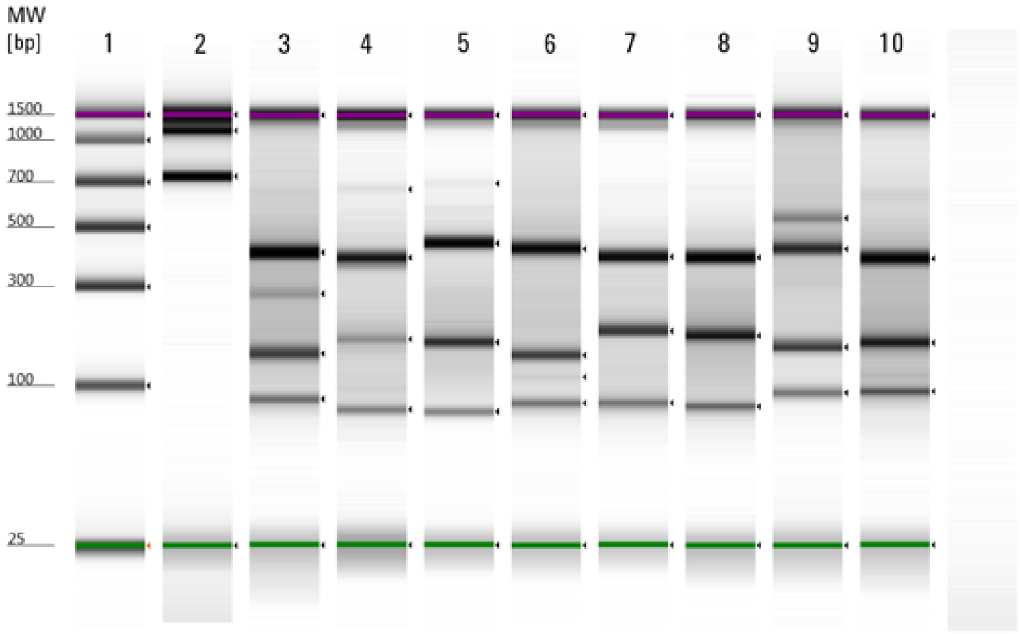


図 4　2200 TapeStation 解析での制限酵素処理の確認
レーン 1：TapeStation High Sensitivity D1000 Ladder、レーン 2：未消化 Enrichment Control DNA、レーン 3-10：ECD 切断反応液 A-H

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、39 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 0.8 µL の Enrichment Control DNA ストック溶液と 3.2 µL 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 50-bp ladder 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 5 にゲル結果電気泳動の例を示します。

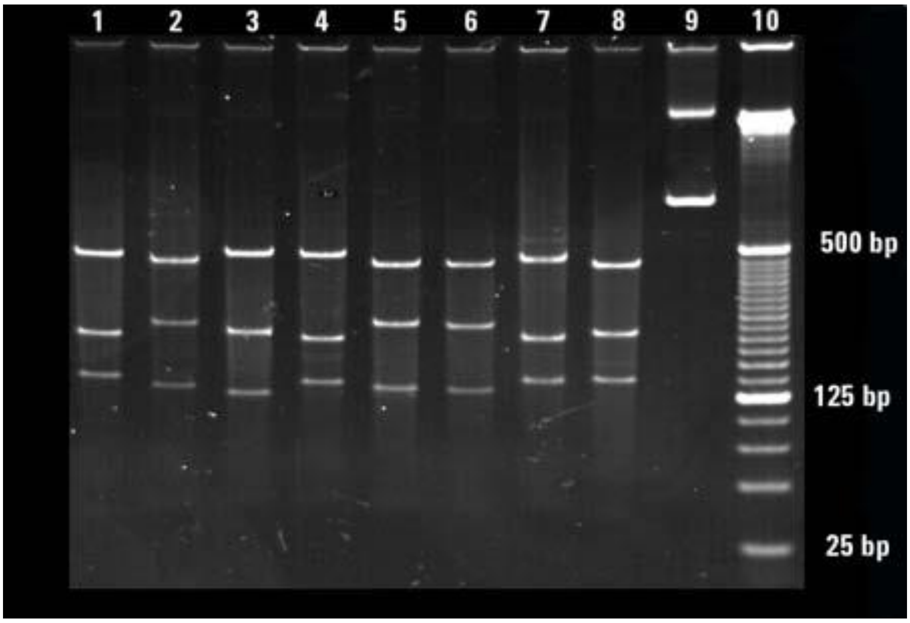


図 5 ゲル電気泳動での制限酵素処理の確認。
レーン 1-8:ECD 切断反応液 A-H、レーン 9:未消化 Enrichment Control DNA、
レーン 10: 25 bp DNA ladder

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、39 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

STEP2. HaloPlex HS または ClearSeq Halo 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 または ClearSeq Halo HS プローブキャプチャ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の時間は、デザインのプローブ数によって決まります。ハイブリダイゼーション時間は、キットに入っている Certificate of Analysis に記載されている時間で行って下さい。

ECD サンプルもハイブリダイゼーション以降のステップにも含めることで、HaloPlex HS 実験のポジティブコントロールとすることができます。最後のステップまで ECD を含めてください。

HaloPlex HS または ClearSeq Halo 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過程の間に、分子バーコードと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。
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、58 ページ以降の HaloPlex HS インデックス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。

1　表 5 の試薬を混ぜ合わせて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 5 ハイブリダイゼーションマスターミックス

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
Hybridization Solution	34 µl	442 µl
HaloPlex HS or ClearSeq HS Probe	5 µl	65 µl
Total Volume	**39 µl**	**507 µl**

2　39 µL のハイブリダイゼーションマスターミックスを 12 本 (サンプルの数分)の 0.2 mL の PCR チューブ (8 連チューブの各ウェルでもかまいません)に分注します。

3 5 µL の適切な **HaloPlex HS Indexing Primer** を、ハイブリダイゼーションマスターミックスを含むチューブに加えます。

それぞれのハイブリダイゼーションチューブには、HaloPlex HS Indexing Primer 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 HaloPlex HS Indexing Primer を使用してください。チューブに加えた HaloPlex HS 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。

この段階でのチューブ 1 ウェルあたり内容量は 44 µL になっています。

ハイブリダイゼーションマスターミックス	39 µL
HaloPlex HS Indexing Primer いずれか 1 種	5 µL
計	44 µL

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。

重要:4 以降の作業を開始する前に次の注意書きを必ずお読みください

【注意】

この時点では、スタート時の gDNA サンプル 1 つにつき、異なる組み合わせの酵素で制限酵素消化反応を行った gDNA サンプルが 8 ウェル分あります。たとえば、サンプル 1 については A1-H1 の 8 種類の制限酵素消化済み gDNA があります。これを、1 ウェルずつ別々に、ハイブリダイゼーションマスターミックスを入れたハイブリダイゼーション反応チューブに直接移していきます。各制限酵素はハイブリダイゼーションマスターミックスと混合することで不活性化します。

そのため、ハイブリダイゼーションマスターミックスに入れる前の段階で、各制限酵素消化物を絶対にプールしないでください。各制限酵素は活性を保っており、直接プールすると予定外の消化が起こって正しくハイブリダイズできなくなります。

4 96 ウェル Restriction Digest Reaction Plate の制限酵素消化 DNA サンプルを、直接 step 3 で調製したハイブリダイゼーション反応チューブに移します。

マルチチャネルピペットを使い、ECD 以外のサンプルについて、A 行の制限酵素消化済み DNA サンプルを 7 µL とり、39 µL のハイブリダイゼーションマスターミックスと 5 µL の HaloPlex HS Indexing Primer の入ったハイブリダイゼーション反応チューブに加え、ピペッティングでよく混ぜます。

次に B 行のサンプルを 7 µL 取り、同様にハイブリダイゼーション反応チューブに加えて混合します。この操作を H 行まで繰り返します。

ECD サンプルについては各反応液を 2.5 µL ずつ、同様にハイブリダイゼーション反応チューブに加えて混合します。

この段階でのチューブ 1 ウェルあたり内容量は ECD サンプルで約 64 µL，サンプルで約 100 µL になっています。

	ECD	サンプル
ハイブリダイゼーションマスターミックス	39 µL	39 µL
HaloPlex HS Indexing Primer いずれか 1 種	5 µL	5 µL
制限酵素処理サンプル	20 µL	56 µL
計	64 µL	100 µL

ECD サンプルについては、**36 µL の Nuclease-free water** を加え、制限酵素消化の確認に使用した量を補います。ECD サンプルにも gDNA が含まれており、以降の実験でもポジティブコントロールとして用いて実験の成否を確認することができます。ECD サンプルも最後まで実験に含めてください。

最終的に、各ハイブリダイゼーション反応液には、以下のものが含まれます。

- 39 µL Hybridization Master Mix
- 5 µL HaloPlex HS Indexing Primer
- 合計約 56 µL の制限酵素消化 gDNA サンプル

NOTE

サンプルの一部が蒸発して、各ウェルからの回収量が 7 µL を下回ることがあります。制限酵素消化した gDNA 容量がわずかに足りないだけであれば、ハイブリダイゼーションの結果には問題ありません。サンプルが蒸発した分を補う必要はありません。

5 チューブにキャップをし、ハイブリダイゼーション反応液を短時間のボルテックスにより混合し、スピンダウンします。

6 ハイブリダイゼーション反応チューブをサーマルサイクラーにセットし、表 6 のプログラムを実行します。Hot Top を使用します。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。

こ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。

表 6 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

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

† 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。

CAUTION

このステップで使用するサーマルサイクラーは最大反応液量を 100 µL 以上に設定できる機種をご使用ください。

本プロトコルの実験条件は容量 100 µL のハイブリダイゼーションを SureCycler（反応容量 10-100 µL）を使用して最適化されています。その他の機種については使用前に最大反応液量をご確認ください。

7 少なくともハイブリダイゼーション終了の 30 分前に、冷凍庫から次のステップで使用する試薬を取り出し、使用時に適切な温度になっているように準備しておきます。

- -20℃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、室温に戻しておきます。

NOTE 使用前に、HS Hybridization Stop Solution が室温に戻っていることを確認して下さい。試薬の粘性が非常に高いため、低温のままだと正確なピペッティングが難しくなります。

- 4℃の冷蔵庫より、Agencourt AMPure XP magnetic beads と、Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads を取り出し、室温に置いておきます。
- -20℃のボックスから、10 mM rATP、HS DNA ligase を取り出し、氷上においておきます。

STEP3. ハイブリダイゼーションバッファの除去

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、次のライゲーションステップの準備をします。

NOTE 精製前に、AMPure XP beads と HS Hybridization Stop Solution が室温に戻っていることを確認して下さい。使用の 30 分前から室温に置いて下さい。

1 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。**8** で使用します。

2 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。

3 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 80 µL** と、**HS Hybridization Stop Solution 20 µL** の混合液を作り、均一な状態になるまでよく混ぜます。

NOTE HS Hybridization Stop Solution は非常に粘性が高いので、確実に全量を吸い上げ、吐き出せるようにゆっくりとピペッティングを行ってください。ピペットチップ内に溶液が残っていないことを確認してください。

4 前ステップで調製した AMPure XP ビーズと HS Hybridization Stop Solution の混合液 100 µL を、ハイブリダイゼーションサンプル 100 µL が入ったチューブに加えます。200 µL ピペット を 150 µL にセットし、ピペッティングを 10 回行って確実に混ぜて下さい。

5 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、ボルテックスを用いて 1300 rpm のスピードで溶液を撹拌し続けます。5 分のインキュベーションでサンプルがしっかり混ざっていることを確認して下さい。

NOTE このステップの間に、次の STEP4. 環状化ターゲット断片のライゲーションの 1、2 に書かれている試薬を準備します。

6 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）

7 チューブをマグネットプレートにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上清を取り除きます。ピペットチップがビーズに触れないように注意して下さい。

8 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。

9 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。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。

10　8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。（計 2 回の洗浄）

11　軽くスピンダウンし、チューブをマグネットプレートにセットし、10 µL 容量のピペットで残存エタノールを取り除きます。

12　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。（約 1-5 分）

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。

NOTE　ビーズを乾燥させ過ぎないように注意してください。ビーズを乾燥させ過ぎると次の STEP 4, Step 4 でビーズを再懸濁しにくくなり溶出効率が下がります。

STEP4. 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、DNA ライゲーション溶液をハイブリダイゼーション後の環状化 DNA に加え、HaloPlex HS Indexing Primer Cassette とキャプチャされたターゲット断片の間のニックを閉じます。

1　10 mM の rATP を 1:10 で Nuclease-free water と混ぜ、1 mM の rATP solution を用意します。12 サンプル分では、1 µL の rATP と 9 µL の Nuclease-free water を混ぜます。

2　以下の表 7 のように試薬を混合し、DNA ライゲーションマスターミックスを準備します。

表 7 DNA ライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
HS Ligation Solution	10 µl	130 µl
1 mM rATP (prepared in step 1)	0.6 µl	7.8 µl （10 µL から 7.8 µL を使用）
Nuclease-free water	39.4 µl	512.2 µl
Total Volume	**50 µl**	**650 µl**

3　DNA サンプルチューブをマグネットプレートから取り出し（33 ページの 12 より）、50 µL の **DNA ライゲーションマスターミックス**を各 DNA サンプルチューブのビーズに加えます。

4　100 µL のマルチチャンネルピペットを 40 µL にセットしたものを使用し、ビーズを 10 回のピペッティングでよく混ぜます。
ビーズが完全に懸濁されていることを目視で確認してください。必要に応じて、均一になるまで再度ピペッティングによる混合を行ってください。

2. サンプル調製

5 室温で 2 分間インキュベートし、ビーズから DNA サンプルを溶出します。

6 軽くスピンダウンし液をチューブの底に集め、チューブをマグネットプレートに置きます。溶液が透明になるまで待ちます。(約 5 分間)

7 各サンプルにつき、47.5 µL の透明な上清を新しいチューブに移します。
上清にビーズが混入しないよう、ピペット操作はゆっくり行って下さい。

8 各サンプルチューブに、2.5 µL ずつ、HS DNA Ligase を加えます。穏やかにボルテックを行い、 軽くスピンダウンして溶液を集めます。

9 ライゲーション反応チューブにキャップをしてサーマルサイクラーにセットし、55°C で 10 分間インキュベートします。Hot Top は使用します。サーマルサイクラーのプログラムに、10 分のインキュベーション後の低温での Hold のステップは加えないで下さい。低温で Hold してもライゲーション反応をストップさせることはできません。
10 分間のインキュベーションの間、次のステップで使用する以下の試薬を用意しておきます。
   - Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads（35 ページ STEP5. ターゲット DNA のキャプチャの **1** と **2** に従って準備して下さい）
   - Wash 1 Mix（36 ページ STEP5. ターゲット DNA のキャプチャの **3** に従って準備して下さい。）

STEP5. ターゲット DNA のキャプチャ

このステップでは、ビオチン化された HaloPlex HS プローブとターゲット DNA 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。

1 **Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads** をボルテックスでしっかり撹拌します。
Magnetic Beads は保管中に沈澱していますので、容器の底に沈殿が残らないようによく撹拌してください。

2 キャプチャ反応のため、以下の手順で1サンプルあたり40 µL（1 反応分）の **Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads** を **HS Capture Solution** で調製します。
1 回あたりのサンプル数がより多い、または少ない場合、ビーズ懸濁液と HS Capture Solution の容量を調節してください。40 µL x (サンプル (reaction) 数 +1) で計算します。

a 下表にしたがって、ビーズ懸濁液を 1.5 mL チューブに移します。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 bead suspension	40 µl	520 µl

b チューブを 1.5 mL チューブが使える磁石スタンドに 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、透明な上清をピペットで取り除きます。

d 1.5 mL チューブを磁石スタンドから取り出します。同量の（12 サンプル/回の場合 520 µL）の **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。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
HS Capture Solution	40 µl	520 µl

3 37 ページで使用する Wash 1 Mix を以下の手順で準備します。

a 1サンプル当たり、10 μL（+余剰分）の 1 M NaOH を、10 M NaOH 以上のストック溶液から 用時調整します。

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 溶液をい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。とくにサンプル数が多い場合にご注意ください。

b 下記に従って試薬を混ぜ、Wash 1 Mix を調製します。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
HS Wash 1 Solution	90 µl	1170 µl
1 M NaOH (prepared in step a)	10 µl	130 µl
Total Volume	**100 µl**	**1300 µl**

4 **サーマルサイクラーからライゲーション反応チューブを取り出し、すぐに、2** で準備した 40 μL の **HS Capture Solution + Streptavidin bead mixture** をそれぞれのライゲーション反応サンプル 50 μL に加えます。

NOTE ビーズをライゲーション反応液に加える際、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。

5 Step 4 で調製したサンプルを 15 分間室温で継続的に撹拌しながらインキュベートします。撹拌速度は 1300 rpm が目安です。

15 分のインキューベーションの間、ウェルがしっかり撹拌されていることを確認して下さい。

（この間に 38 ページ、STEP6. キャプチャしたターゲット DNA の PCR 増幅 で使用する PCR マスターミックスを準備しておくと便利です。）

撹拌に使用するボルテックスは 8 連チューブがセットできるものが便利です。

6 軽くサンプルをスピンダウンして、チューブをマグネットプレートに移します。

7 溶液が透明になるまで待ち、ピペッティングで上清を注意深く取り除きます。

8 ビーズに結合したサンプルを wash します。

a マグネットプレートからキャプチャ反応チューブを取り出し、**3** で作製した **Wash 1 Mix** 100 µL を各チューブに加えます。

b 100 µL のマルチチャンネルピペットを 80 µL にセットしたものを使用し、10 回ピペッティングしてビーズを完全に再懸濁させます。その後、軽くスピンダウンします。

c 1 分間室温に置いて、インキュベーションします。

d チューブをマグネットプレートに移します。溶液が透明になるまで待ち、ピペッティングで上清を取り除きます。

e マグネットプレートからキャプチャ反応チューブを取り出し、150 µL の HS Wash Solution 2 を各チューブに加えます。

f 10 回のピペッティングでビーズを再懸濁させ、軽くスピンダウンします。

g チューブをマグネットプレートに移します。溶液が透明になるまで待ち、ピペッティングで上清を取り除きます。

STEP6. キャプチャしたターゲット DNA の PCR 増幅

このステップではキャプチャしたターゲットライブラリの PCR による増幅を行います。

1　下の表 8 に示す試薬を混ぜ合わせて **PCR マスターミックス**を氷上で調製します。

表 8 PCR マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 12 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	53.2 µl	691.6 µl
Herculase II Reaction Buffer	30 µl	390 µl
dNTPs (100 mM, 25 mM for each dNTP)	0.8 µl	10.4 µl
Primer 1	4 µl	52 µl
Primer 2	8 µl	104 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase	4 µl	52 µl
Total	**100 µl**	**1300 µl**

2　穏やかにボルテックスすることでマスターミックスを混合します。マスターミックスチューブは次のステップ **3** で使用するまで、氷上に置いておきます。

NOTE　PCR マスターミックスは 36 ページに記載の 15 分のキャプチャステップで行っておくと便利です。

3　37 ページ **g** で、wash を終えた DNA サンプルを、マグネットプレートから取り出し、各サンプルチューブに PCR マスターミックスを 100 µL ずつ加えます。数回ピペッティングを行い、ビーズを均一に再懸濁して下さい。

4　増幅反応チューブをサーマルサイクラーにセットし表 9 に従ってプログラムを実行します。Hot Top は使用します。

最適な増幅サイクル数は HaloPlex HS, ClearSeq Halo HS の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。

表 9 HaloPlex HS キャプチャ後 DNA 増幅 PCR プログラム

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

この段階で次に使用する Agencourt AMPure XP ビーズを 4℃冷蔵庫から取り出し、
室温に戻しておきます。

5 PCR のプログラムが終了したら、PCR 反応チューブを軽くスピンダウンし、マグネットプレートに置きます。

6 液が透明になるまで待ちます。各 PCR 反応サンプルを 40 µL ずつ取り出し、精製のために新しい 0.2 mL チューブに移します。

残りの反応液は-20℃で保存し、トラブルシューティング時に使用することができます。

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。

STEP7. 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 を AMPure XP ビーズを使用して精製します。

1 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。

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。**9** で使用します。

3 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。

4 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 water 40 µL** の混合液を作り、均一な状態になるまでよく混ぜます。

5 **4** で調製した AMPure XP ビーズと Nuclease-free water の混合液 140 µL 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ボルテックスでよく攪拌します。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。

6 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、ボルテックスの最高回転数で溶液をよく撹拌し続けます。

7 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）

8 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、透明な上清を取り除きます。

9 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。

10 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。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。

11 **9** と **10** のステップをもう一度繰り返します。（計 2 回の洗浄）

12 10 µL 容量のピペットで残存エタノールを取り除きます。

13 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（約 1~5 分）。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。

14 マグネットプレートからチューブを取り出し、各サンプルに **45 µL** の **HS Elution Buffer** を加えます。

15 100 µL ピペットを 30 µL にセットしたものを使用し、10 回のピペッティングで完全に混ぜます。

16 室温で 2 分間インキュベートして DNA を溶出させます。

17 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。

18 上清（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。

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。

STEP8. ターゲットエンリッチメントの確認

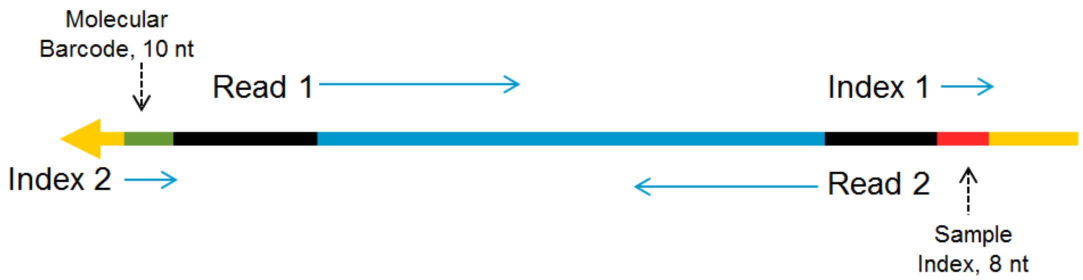
調製したライブラリサンプルをプールし、シーケンスする前にそれぞれのライブラリサンプルの濃縮の確認と濃度の定量を、2100 バイオアナライザ（43 ページ参照）または 4200 TapeStation または 2200 TapeStation（45 ページ参照）を用いて行います。

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 6 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。定量には、175 bp から 625 bp の間のアンプリコンを使います。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。

http://Agilentgenomics.jp

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、STEP7 (40 ページ)の AMPure 精製を行います。

図 7 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。

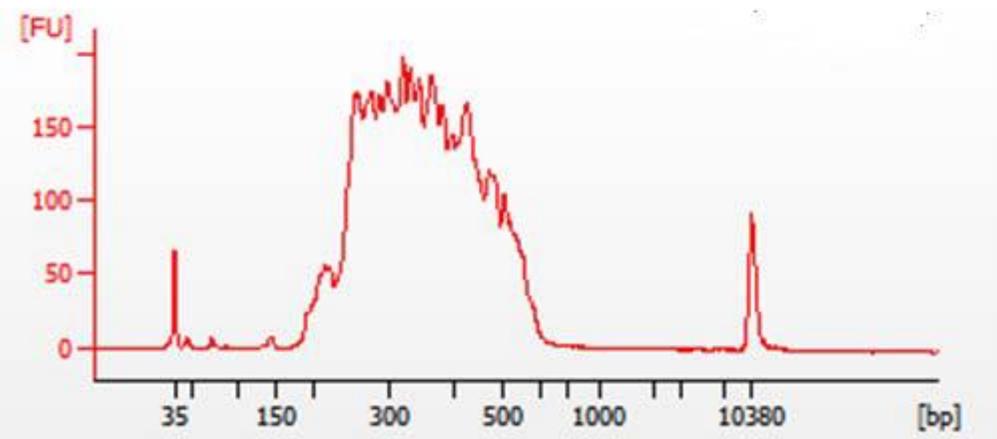


図 7 2100 バイオアナライザ解析による HaloPlex HS エンリッチメントの確認

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　バッファー (10 mM Tris, 1 mM EDTA)を使用し、2000 rpm の IKA ボルテックスで 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 と試薬キットを使用し、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、*4200 TapeStation User Manual* または *2200 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。
http://Agilentgenomics.jp
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お問い合わせ窓口にお問い合わせください。

1 *4200 TapeStation User Manual* または *2200 TapeStation 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 x 2 回、確実に混合してください。

2 *4200 TapeStation* または *2200 TapeStation 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場合には、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 STEP 7 (40 ページ)の AMPure 精製を行います。

図 8 に TapeStation 電気泳動結果の例を示します。

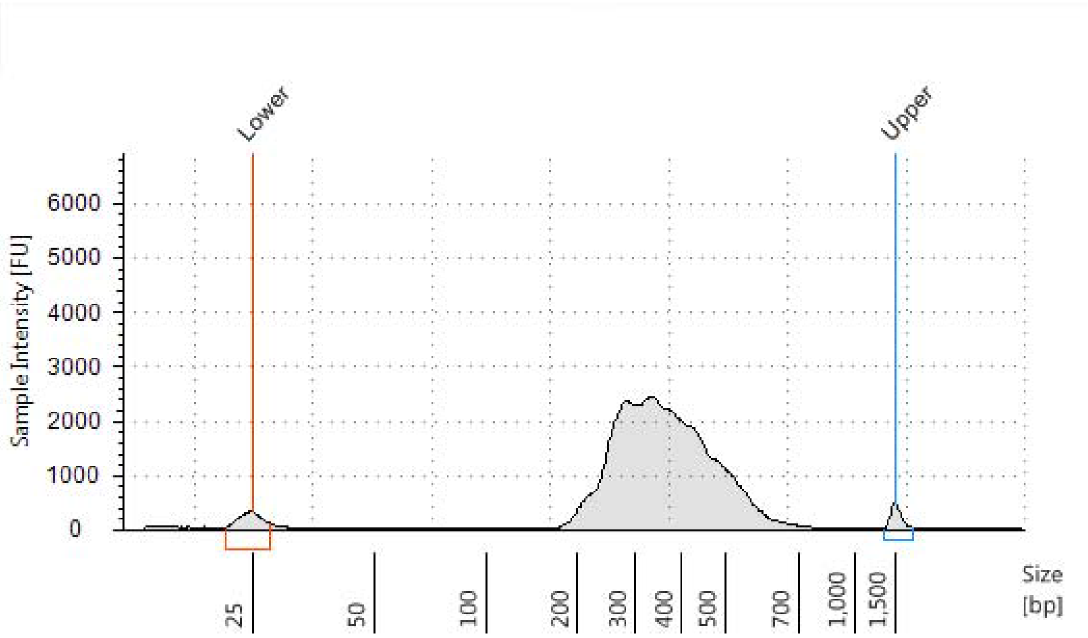


図 8　 2200 TapeStation 解析での HaloPlex HS エンリッチメントの確認

STEP9. 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 および NexSeq 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 プラットフォームについては、49-52 ページに記載された、Illumina Experiment Manager (IEM) を用いてカスタムサンプルシートを作成する方法とその下のガイドラインに沿ってランの設定を行って下さい。

  HiSeq、NextSeq プラットフォームについては、装置の画面に沿って、52 ページに記載されたガイドラインに従ってランの設定を行って下さい。

- 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。

- 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、黄色のプレートまたは白キャップのチューブに入ったインデックスを使用している場合は、58 ページの表 17 を参照し、オレンジのプレートに入ったインデックスを使用している場合は、59 ページの表 18 を参照して下さい。分子バーコード(i5)は、全てのサンプルで NNNNNNNNNN と設定して下さい。

- 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、52 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。

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれるすべての 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 10 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 10 トータル量 20 µL 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整を行います。
  - 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、NextSeq いずれの場合も、必要な Read length を確認し、Read1、Read2 に 加えて 8 bp のインデックス 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設定ガイドライン

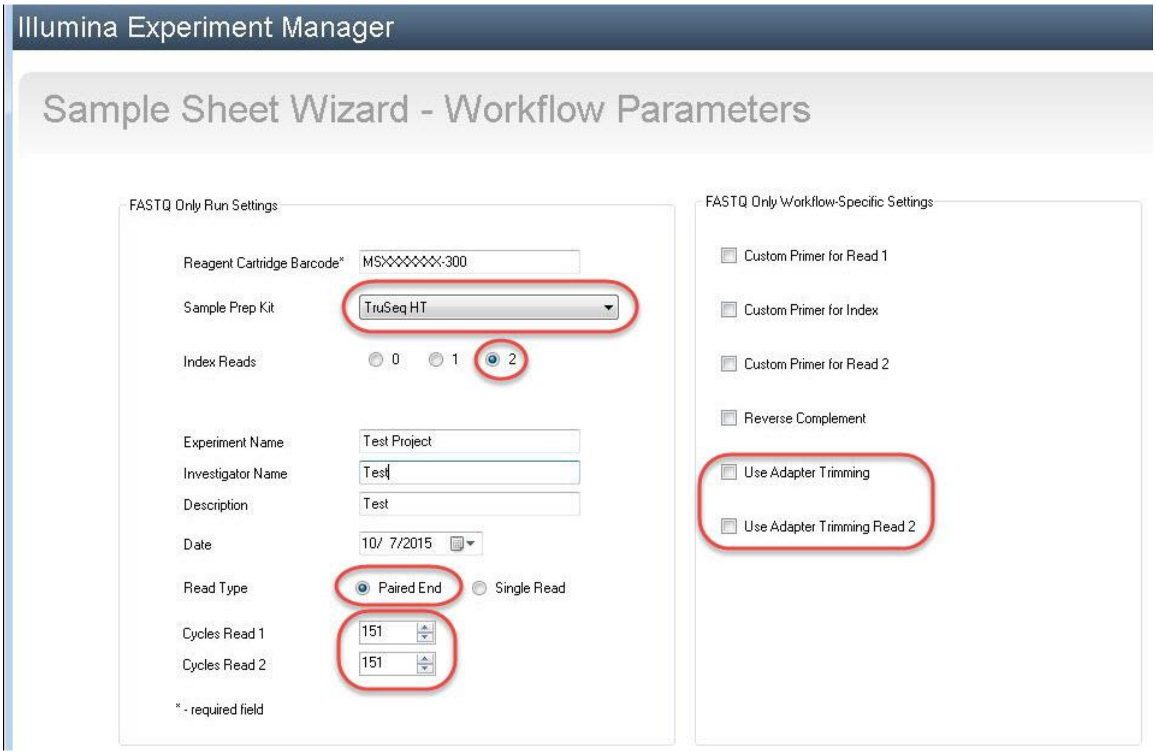
以下のガイドラインに従って、Illumina Experiment Manager (IEM)を用いてカスタムサンプルシートを作成して下さい。一度サンプルシートを作成した後、マニュアルでインデックスの配列を HaloPlex HS インデックス配列に変更する必要があります。HaloPlex HS システムのインデックス塩基配列情報については、4. リファレンス 58 ページ以降を参照して下さい。

カスタムサンプルシートの作成

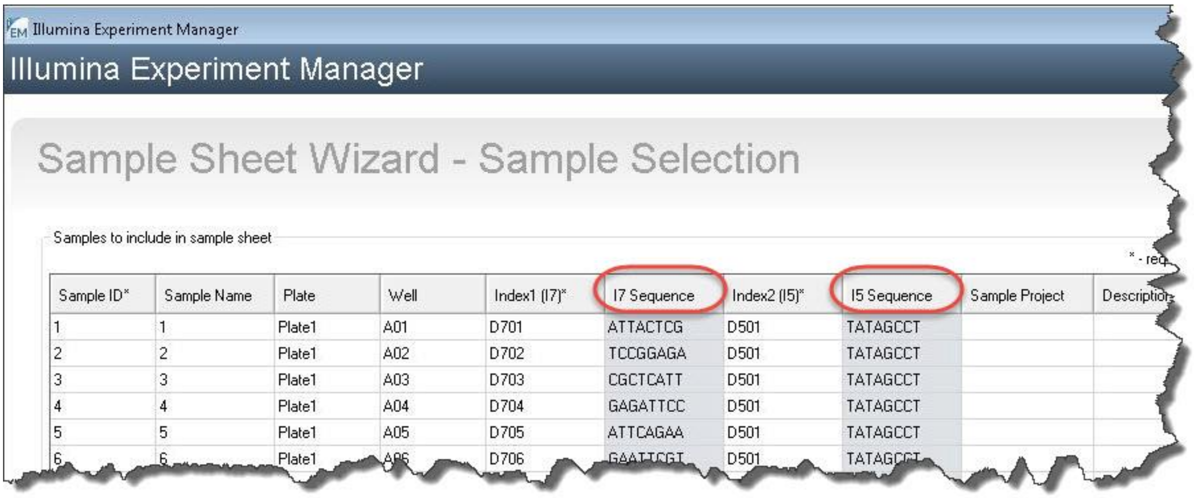
1. IEM ソフトウェアを開き、下記のワークフローに従って MiSeq プラットフォーム用のサンプルシートを作成します。

    - **Select Category** で、Other を選択します。
    - **Select Application** で、FASTQ Only を選択します。

2. **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。



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。I7 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。



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バ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、或いは白キャップのついた 16 反応用のチューブをご使用の場合は、58 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、59 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（図 9 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、「MolBC」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”NNNNNNNNNN”を入力します。

[Header]									
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	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	Sample_Project	Description
1	1	Plate1	A01	A01	ATGCCTAA	MolBC	NNNNNNNNNN		
2	2	Plate1	A02	A02	AGCAGGAA	MolBC	NNNNNNNNNN		
3	3	Plate1	A03	A03	ATCATTCC	MolBC	NNNNNNNNNN		

図 9 HaloPlex HS カスタムサンプルシート作成例

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。

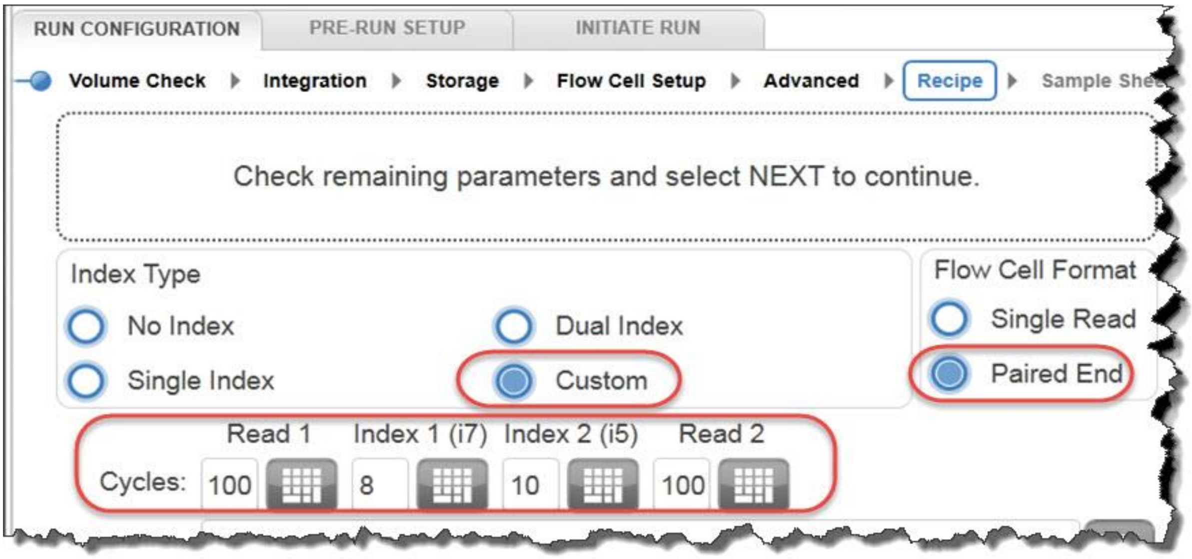
```
MiSeq Reporter.exe.config - Notepad
File  Edit  Format  View  Help
<?xml version="1.0"?>
<configuration>
  <appSettings>
    <add key="Repository" value="D:\Illumina\MiSeqAnalysis" />
    <add key="GenomePath" value="C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes" />
    <add key="TempFolder" value="D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Temp" />
    <add key="EnableHTTPService" value="1"/>
    <add key="DefaultRedirectPath" value="Default.htm"/>
    <add key="ClientSettingsProvider.ServiceUri" value="" />
    <add key="CopyToRTAOutputPath" value="1"/>
    <add key="MaximumHoursPerProcess" value="72"/>
    <add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>
  </appSettings>
  <startup>
    <supportedRuntime version="v4.0" sku=".NETFramework,Version=v4.0" />
  </startup>
  <system.web>
    <membership defaultProvider="ClientAuthenticationMembershipProvider">
      <providers>
        <add name="ClientAuthenticationMembershipProvider" type="System.Web.ClientServices.Providers.ClientFormsAuthentica
      </providers>
    </membership>
    <roleManager defaultProvider="ClientRoleProvider" enabled="true">
      <providers>
        <add name="ClientRoleProvider" type="System.Web.ClientServices.Providers.ClientRoleProvider, System.Web.Extensions
      </providers>
    </roleManager>
  </system.web>
  <runtime>
    <gcConcurrent enabled="false"/>
  </runtime>
</configuration>
```

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。



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

3. Appendix: FFPE 由来の DNA サンプル使用について

本章に記載されている方法で DNA の定量と分解度を確認することにより、FFPE 由来の DNA を HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントに使用する事が可能です。Agilent NGS FFPE QC Kit は、使用するヒトゲノム DNA の品質チェックと、定量を行う qPCR ベースのキットです。このキットを用いて、長さの異なる 2 種類のアンプリコンの増幅を比較することで算出される Sample Quality Score（ΔΔCq 値）と、より正確な DNA の定量値を算出することが出来ます。本章では、このキットで算出した Sample Quality Score に基づいて、HaloPlex HS プロトコルの実験条件およびシーケンス条件を最適化する方法を記載しています。

NOTE

SureDesign で FFPE サンプルに対応した HaloPlex HS プローブデザインする際は、"遺伝子または領域のタイリング" スクリーンで、"FFPE サンプルに最適化"にチェックを入れて下さい。このオプションを使用するには、SureDesign にログイン後、"アドバンストオプション表示" のチェックボックスにチェックを入れて下さい。

以下に記載する HaloPlex HS プロトコルの実験条件およびシーケンス条件の最適化は、この"FFPE サンプルに最適化"オプション利用の有無に関わらず、全てのプローブデザインに対して適用することが出来ます。

HaloPlex HS プロトコル実験条件の最適化

プロトコルの最適化を行う前に、Agilent NGS FFPE QC Kit を用いて Sample Quality Score（ΔΔCq 値）と、各 FFPE サンプルの増幅可能な DNA 定量値を算出します。Agilent NGS FFPE QC Kit の詳細な英文プロトコルは、下記のウェブサイトからダウンロードすることが可能です。
http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G9700-90000.pdf

表 11 Sample Quality Score（ΔΔCq 値）による HaloPlex HS プロトコルの最適化

Protocol Step and Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		ΔΔCq≤1.3	ΔΔCq between 1.3 and 1.5	ΔΔCq 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

* ΔΔCq 値が> 2.5 以上の FFPE サンプルでも、HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントを行うことはできますが、エンリッチメントやシーケンスの結果に影響が出る可能性があります。ΔΔCq 値が> 2.5 以上の FFPE サンプルを用いる場合は、ΔΔCq 値が 1.5-2.5 のサンプルと同じプロトコル改変をおこなってください。

シーケンス条件の最適化

FFPE サンプルをシーケンスする場合に必要なシーケンス量を算出します。

1. Total Sequenceable Design Size を HaloPlex デザインレポートより確認します。
2. 表 12 のガイドラインを参照し、Sample Quality Score （ΔΔCq）値を基に、必要なシーケンス量を決定します。

表 12 ΔΔCq 値を基にした FFPE サンプルの推奨シーケンス量の目安

ΔΔCq 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

* ΔΔCq 値が> 2.5 以上の FFPE サンプルでも、HaloPlex HS ターゲットエンリッチメントを行うことはできますが、エンリッチメントやシーケンスの結果に影響が出る可能性があります。ΔΔCq 値が> 2.5 以上の FFPE サンプルを用いる場合は、ΔΔCq 値が 1.5-2.5 のサンプルと同じプロトコル改変をおこなってください。

NOTE 非 FFPE サンプルのシーケンス量のガイドラインは、Total Sequenceable Design Size のおよそ x200 のカバレッジを得ることを基準としています。

例えば、Total Sequenceable Design Size が 1 Mb の場合で、ΔΔCq 値が 1.4 の FFPE サンプルにおいて、非 FFPE サンプルをシーケンスした場合の、平均 x200 カバレッジと同等のシーケンスデータを得るには、600-1200 Mb のシーケンス量が必要になります。

4. リファレンス

試薬一覧

HaloPlex HS Target Enrichment System 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 13 HaloPlex HS, ClearSeq Halo HS Target Enrichment Kit 構成試薬一覧

	Part Numbers for HaloPlex HS Target Enrichment System-ILM* (Store at –20°C)		
Design Type	**96 Reactions**	**48 Reactions**	**16 Reactions**
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST	5190-7847 **OR** 5190-7849†	5190-7835 **OR** 5190-7837†	—
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM	5190-7851 **OR** 5190-7853†	5190-7839 **OR** 5190-7841†	—
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM	5190-7855 **OR** 5190-7857†	5190-7843 **OR** 5190-7845†	—
ClearSeq Cancer HS, ILM	G9933B	—	G9933A
ClearSeq AML HS, ILM	G9963B	—	G9963A
ClearSeq Cardiomyopathy HS, ILM	G9943B	—	G9943A
ClearSeq ICCG HS, ILM	5190-9200	5190-9182	—
ClearSeq Connective Disorder HS, ILM	5190-9220	5190-9186	—
ClearSeq Arrhythmia HS, ILM	5190-9198	5190-9180	—
ClearSeq Noonan Syndrome HS, ILM	5190-9222	5190-9188	—
ClearSeq Chromosome X HS, ILM	5190-9218	5190-9184	—

* 含まれる試薬については、表 14 を参照してください。

† 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。

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

表 14 HaloPlex HS Target Enrichment kits の構成試薬

Included Reagents	16 Reaction Kit	48 Reaction Kit	96 Reaction Kit
RE Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap	bottle
BSA Solution	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
Enzyme Strip 1	8-well strip with green label	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	8-well strip with red label
Enrichment Control DNA	tube with orange cap	tube with orange cap	tube with orange cap
Hybridization Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
HS Hybridization Stop Solution	tube with clear cap	tube with clear cap	bottle
HS Ligation Solution	tube with black cap	tube with black cap	tube with black cap
HS DNA Ligase	tube with green cap	tube with green cap	tube with green cap
10 mM rATP	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
HS Wash 1 Solution	bottle	bottle	bottle
HS Wash 2 Solution	bottle	bottle	bottle
HS Capture Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
HS Elution Buffer	tube with purple cap	bottle	bottle
Primer 1	tube with yellow cap	tube with yellow cap	tube with yellow cap
Primer 2	tube with blue cap	tube with blue cap	tube with blue cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
Herculase II Reaction Buffer	tube with black cap	bottle	bottle
100 mM dNTP Mix	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
HaloPlex HS or ClearSeq HS Probe	tube with pink cap	tube with pink cap	tube with pink cap
HaloPlex HS Indexing Primers	Indexing Primers A01 to H02 in white-capped tubes	Indexing Primers A01 to H06 in orange 96-well plate*	Indexing Primers A01to H12 in yellow or orange 96-well plate†

* 表 15 のプレートマップを参照してください。

† 表 16 のプレートマップを参照してください。

表 15 HaloPlex HS HaloPlex HS Indexing Primer A01 から H06 のプレートマップ: 48 反応キット用で、7-12 列は空ウェル

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	–	–	–	–	–	–
B	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 16 HaloPlex HS HaloPlex HS Indexing PrimerA01 から H12 のプレートマップ: 96 反応キット用

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	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

HaloPlex HS インデックスの塩基配列

各 HaloPlex HS Indexing Primer の 8 塩基のインデックス部分の塩基配列を以下の表に示します。HaloPlex HS 16 反応キットには、A01 から H02 の 16 種類のプライマーカセットが入ったチューブが含まれます。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 反応キットはプレートの色によって F09 インデックスの配列が異なるため、適切なインデックス配列表を参照して下さい。黄色のプレートは下の表 17 を参照し、オレンジ色のプレートは 59 ページの表 18 を参照して下さい。

表 17 黄色プレートまたは白キャップチューブの HaloPlex HS のインデックス配列

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	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA	E06	ATTGAGGA	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 18 オレンジ色プレートの HaloPlex HS のインデックス配列

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	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	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

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
本プロトコルに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。

Agilent Technologies