



HaloPlex 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 E.0 対応
[2014 年 12 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 Target Enrichment System for Illumina Sequencing
for Illumina Sequencing

Version E0, December 2014

G9900-90001

に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント HaloPlex 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 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. 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 E0 での変更点（2014 年 12 月）

- ・Indexing Primer Cassette の並び順を変更した新しいキットのリリースに伴い、新しい構成のキット、旧来の構成のキットの 2 種類に対応したプロトコルになりました。

Indexing Primer Cassette が白色キャップのチューブ（16 反応キット）、もしくは青色プレート（48 反応キット、96 反応キット）に入っている場合（2014 年 12 月以降に納品されたキット）、キットには A01 から H12 の 8-bp index が含まれています。サンプルに Index をアサインする際は、p55 から p56 に記載の Indexing Primer Cassette 配置および配列情報を参照してください。

Indexing Primer Cassette が透明キャップのチューブ（16 反応キット）、もしくは透明プレート（48 反応キット、96 反応キット）に入っている場合（2014 年 11 月以前に納品されたキット）、キットには 1 から 96 の 8-bp index が含まれます。サンプルに Index をアサインする際は、p59 から p65 に記載の Indexing Primer Cassette 配置および配列情報を参照してください。

- ・ClearSeq AML Halo リサーチパネルに対応しました。
- ・HaloPlex 心筋症リサーチパネルに対応しました。
- ・HaloPlex Cancer リサーチに対応しました。
- ・酢酸、NaOH のサプライヤー情報を更新し、NaOH の調製方法を変更しました
- ・実験の所要時間についての情報を追加しました。
- ・FFPE サンプルから抽出された DNA に対応しました。
- ・制限酵素マスターミックスの調製方法の記述を変更しました。
- ・解析ソフトウェア SureCall についての情報を追加しました。

Ver D.3 での変更点（2013 年 1 月）

- ・ハイブリダイゼーションの時間を決定するための基準を更新し、Certificate of Analysis を参照する記載に変更しました。
- ・Restriction Enzyme マスターミックスの調製方法を更新しました。
- ・12 反応単位での実験に対応した記述に更新しました。
- ・AMPure ビーズ精製ステップ（38 ページ、9.）で上清を除去する際に使用するピペッターとセットする容量を変更しました。

目次

1. はじめに 6

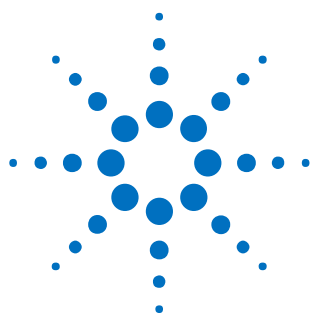
- 操作に関する注意 7
- 安全に関する注意 7
- 実験に必要な試薬 8
- 実験に必要な装置、消耗品類 10
- サンプル QC に使用する装置、消耗品類 11

2. サンプルの調製 12

- 1 回あたりのサンプル数の検討 15
- 実験の所要時間についての情報 15
- STEP1. gDNA の制限酵素処理による断片化 16
- STEP2. HaloPlex 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 28
- STEP3. ターゲット DNA のキャプチャ 33
- STEP4. キャプチャした環状化ターゲット断片のライゲーション 36
- STEP5. PCR マスターミックスの調製 37
- STEP6. キャプチャした DNA の NaOH での溶出 38
- STEP7. 溶出したターゲット DNA の PCR 増幅 39
- STEP8. 増幅したターゲットライブラリの精製 40
- STEP9. ターゲットエンリッチメントの確認 42
- STEP10. 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 47

3. リファレンス 52

- 新しい Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が青色プレートまたは白色キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧 53
- HaloPlex Index の塩基配列 (青色プレートまたは白色キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette) 56
- 旧来の Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が透明プレートまたは透明キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧 57
- HaloPlex Index の塩基配列 (透明プレートまたは透明キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette) 60



1. はじめに

操作に関する注意 7

安全に関する注意 7

実験に必要な試薬 8

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 11

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

HaloPlex 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 Target Enrichment System キットに対応しています。G9906A, G9906B の HaloPlex Exome Target Enrichment System には対応していません。
- ・ HaloPlex プロトコルでは 200 ng のゲノム DNA (gDNA, 8 組の制限酵素反応用に分注) と 25 ng の余剰分で計 225 ng の gDNA 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。STEP 7 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。STEP 8 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。

1. はじめに

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 試薬キット						
HaloPlex Target Enrichment System Kit (以下から選択してください)						
1 kb -500 kb, イルミナ対応, 48 reactions (プローブ数<20K)	Agilent	G9901C	—	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
1 kb -500 kb, イルミナ対応, 96 reactions (プローブ数<20K)	Agilent	G9901B	—	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
501 kb -2.5 Mb, イルミナ対応, 48 reactions	Agilent	G9911C	—	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
501 kb -2.5 Mb, イルミナ対応, 96 reactions	Agilent	G9911B	—	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
2.6 Mb -5 Mb, イルミナ対応, 48 reactions	Agilent	G9921C	—	1	48反応分	48反応分、マルチプレックス対応
2.6 Mb -5 Mb, イルミナ対応, 96 reactions	Agilent	G9921B	—	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
Cancerリサーチパネル, イルミナ対応, 16 reactions	Agilent	G9903A	—	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
Cancerリサーチパネル, イルミナ対応, 96 reactions	Agilent	G9903B	—	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
心筋症リサーチパネル, イルミナ対応, 16 reactions	Agilent	G9908A	—	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
心筋症リサーチパネル, イルミナ対応, 96 reactions	Agilent	G9908B	—	1	96反応分	96反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq AML Halo, イルミナ対応, 16 reactions	Agilent	G9913A	—	1	16反応分	16反応分、マルチプレックス対応
ClearSeq AML Halo, イルミナ対応, 96 reactions	Agilent	G9913B	—	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						
Herculase II Fusion Enzyme with dNTPs (100 mM; 25 mM for each nucleotide)	Agilent	600677 または600679	指定	1 uL	600677 ~ 200 反応分, 600679 ~ 400反応分	600675 (40反応分)にはdNTPが付属しません。6 00675を使用する場合には別途100 mM dNTP (Agilent, 200415)の購入が必要です。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880 または A63881	指定	60 uL	A63880 - 5 mL x1, A63881 - 60 mLx1	
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850 または Q32853	指定		Q32850 - 100 assays, Q32853 - 500 assays	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約2 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				0.5 mL		
2M Acetic Acid	Sigma Aldrich	A8976	相当	0.5 uL	500 mL	
10 M NaOH	Sigma Aldrich	72068-100ML	相当		100 mL	分子生物学実験用グレード
50 mM NaOH (用時調製)				25 uL		10Mのストック溶液から用時調製
1 M Tris-HCl, pH8.0	Sigma Aldrich	T3038-1L	相当		1 L	分子生物学実験用グレード、Tris- acetate pH 8.0でも可
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)				40 uL		

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
Agencourt SPRIPlate Super Magnet Plate (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)	Beckman Coulterまたは 日本ジェネティクス	96ウェルプレート用 A32782, 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	Life Technologies	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	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)	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
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plate	Agilent	401333	相当	Plate 2枚	25プレート	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
Dynal DynaMag-2	Life Technologies	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
0.2 ml 8 strip tube with flat caps	Nippon Genetics	FG-088WF	相当	5 strips	120本	サーマルサイクラーの機種にあわせて選択
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)	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 International	MPS 1000	相当			96ウェルPCRプレートのスピンドアウンができれば可
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最大反応量が 100 uL 以上に設定できるタイプをご使用ください。

サンプル QC に使用する装置、消耗品類

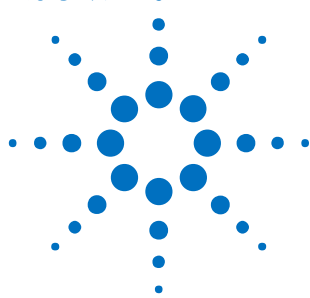
表 3 サンプル QC に使用する装置、消耗品類

＜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。
High Sensitivity 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 Sensitivity 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	Life Technologies	EI0001	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			
DNA molecular weight markers						一般的なものでも可
UV-transilluminator						一般的なものでも可

* 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テープステーションが必要です。

1. はじめに .



2. サンプルの調製

1 回あたりのサンプル数の検討 14

実験の所要時間についての情報 15

STEP1. gDNA の制限酵素処理による断片化 16

STEP2. HaloPlex 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 28

STEP3. ターゲット DNA のキャプチャ 33

STEP4. キャプチャした環状化ターゲット断片のライゲーション 36

STEP5. PCR マスターミックスの調製 37

STEP6. キャプチャした DNA の NaOH での溶出 38

STEP7. 溶出したターゲット DNA の PCR 増幅 39

STEP8. 増幅したターゲットライブラリの精製 40

STEP9. ターゲットエンリッチメントの確認 42

STEP10. 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 47

この章では、アジレントの HaloPlex 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、イリ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。カスタムデザインの場合は、オンラインの SureDesign (www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002284) を使い、カスタム HaloPlex プローブをデザインする必要があります。

HaloPlex 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、その過程でイリ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。

HaloPlex を用いた操作の概略は図 1 をご覧ください。



2. サンプルの調製

プロトコルの流れ

- 1) gDNA を 8 ウェルに分注し、制限酵素消化を行います。



- 2) 制限酵素消化で断片化した gDNA と、HaloPlex プローブライブラリおよびインデックスプライマーカセットをハイブリダイゼーションさせます。ハイブリダイゼーションの結果、ターゲット gDNA 断片と HaloPlex プローブ、インデックスプライマーカセットは一部にニックの入った環状構造を形成します。



- 3) HaloPlex プローブはビオチン化されているので、ターゲット DNA と HaloPlex プローブのハイブリッドをstreptavidin磁性ビーズでキャプチャできます。ライゲーション反応でニックを閉じた後に、アルカリ条件下で 1 本鎖環状 DNA を溶出します。



- 4) ターゲット断片を PCR で増幅します。ターゲット領域が濃縮された、シーケンシング可能なライブラリが完成します。

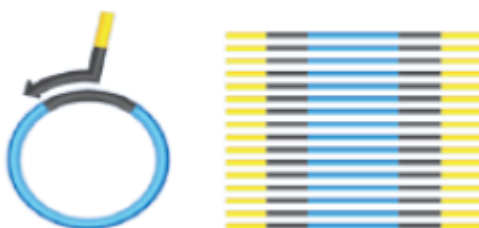


図 1 サンプル調製ワークフロー

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 48 反応あるいは 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せん。

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、24 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 26 倍で計算し、ハイブリダイゼーション以下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 25 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の Box 1 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(3 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、3 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。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。

2. 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。

NOTE

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。以下のプロトコルでは、反応に必要な 200 ng とピペッティングによるロスを考慮した 25 ng のあわせて 225 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 225 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。

FFPE サンプルから抽出した DNA を用いて HaloPlex Target Enrichment System によるライブラリ調製を行う場合は、アジレントの"FFPE-Derived DNA Quality Assessment" (文書番号 G9900-90050、<http://www.genomics.agilent.com> からダウンロード可能)を参照して、DNA の QC を行ってください。このガイドに従って PCR により DNA の断片化度合を評価し、その結果に応じて HaloPlex のプロトコルを一部変更することで、品質の低い DNA 由来の解析のパフォーマンスが改善されます。

- 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。
- 2 gDNA サンプルを調製します。1 回あたり 12 サンプル調製する場合は、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 0.2 mL の PCR チューブに 11 の gDNA サンプル 225 ng を nuclease-free water で 45 μ L の容量になるように調製します。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。gDNA の最終濃度は 5 ng/ μ L となります。氷上に置きます。

- b** 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 45 μ L 分注します。氷上に置きます。

NOTE

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 p15 も参照してください。

- 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成します。その後各 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 17 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。**

2. サンプルの調製

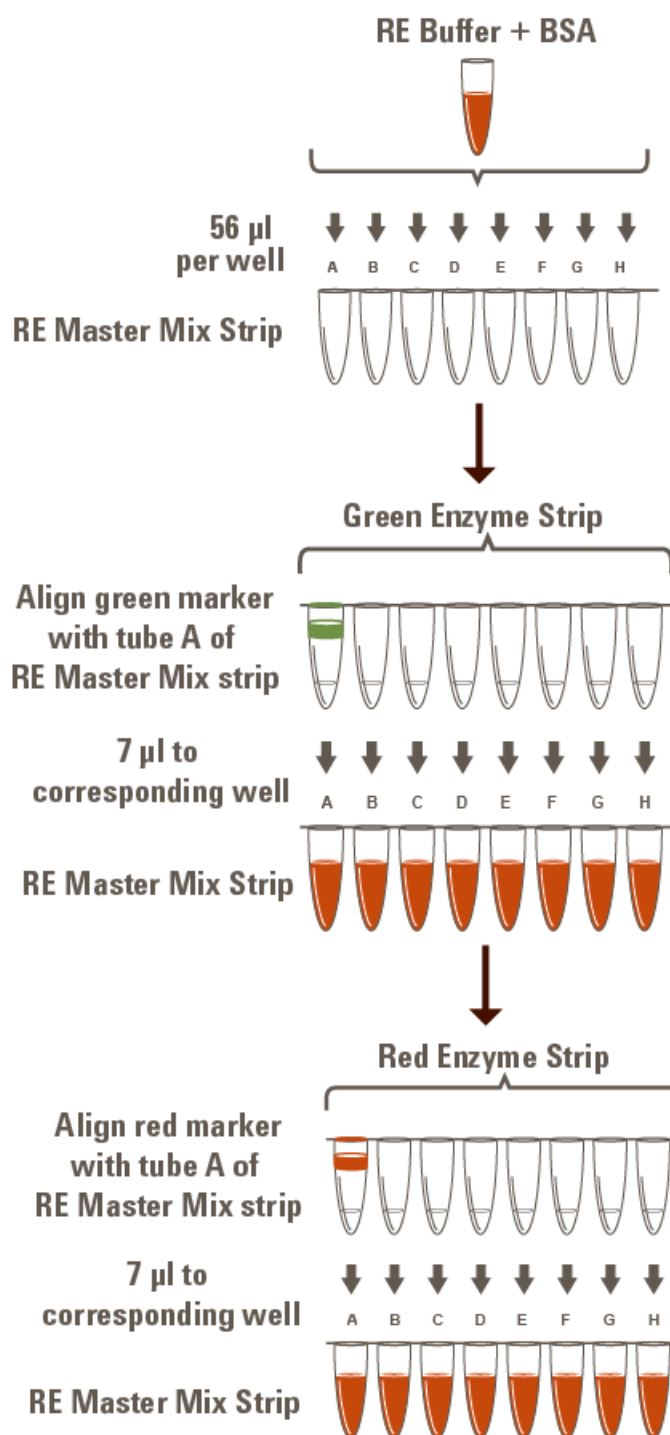


図 2 Restriction Enzyme マスターミックス Strip の調製 (12 サンプルの例)

- 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	34.0 μ L	476 μ L
BSA Solution	0.85 μ L	11.9 μ L
Total Volume	34.85 μL	487.9 μL

- b a で調製した RE Buffer/BSA 混合液を 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	4 μ L	56 μ L

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	0.5 μ L	7 μ L

- 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	0.5 μ L	7 μ L

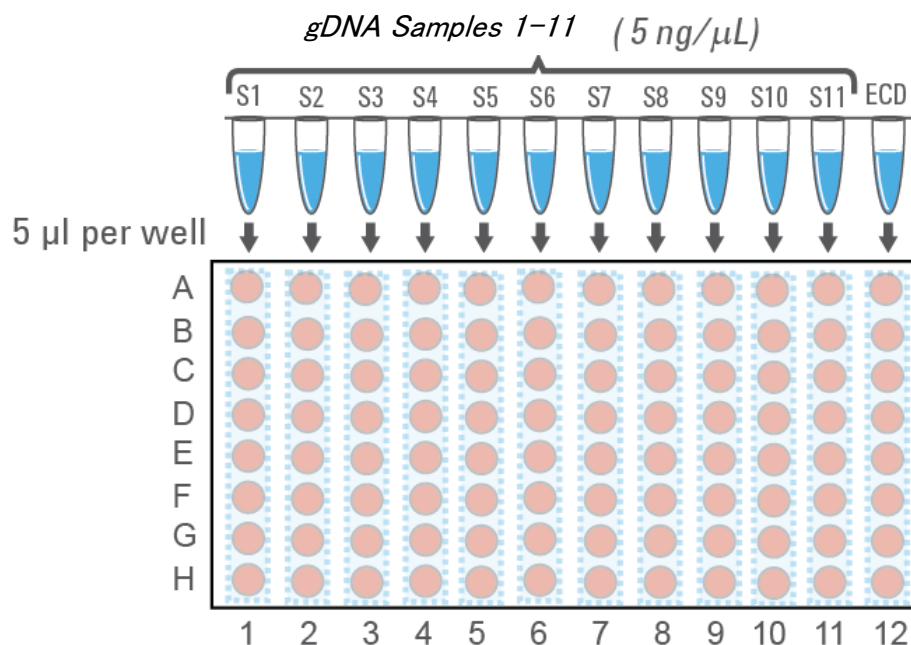
2. サンプルの調製

- 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、スピンドウンします。
 - 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、5 μ L 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ゆきます。
- 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 5 μ L 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 で調製した 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 5 μ L 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。
- 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ドウンします。

調製した 96 ウェルプレートには、10 μ L 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。

2. サンプルの調製

- 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 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	8°C	Hold

CAUTION

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 24 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 の ECD を反応させた該当箇所のウェルから 4 μ L ずつ計 8 つの反応液をとり、8 連 PCR チューブの A-H に移します。
 - b 8 連 PCR チューブにキャップをして、4 μ L 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。
 - c 2100 バイオアナライザ (23 ページ参照)、2200 TapeStation (24 ページ参照)、またはゲル電気泳動 (25 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 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 由来のスミ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。

2. サンプルの調製

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 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 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。

にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。

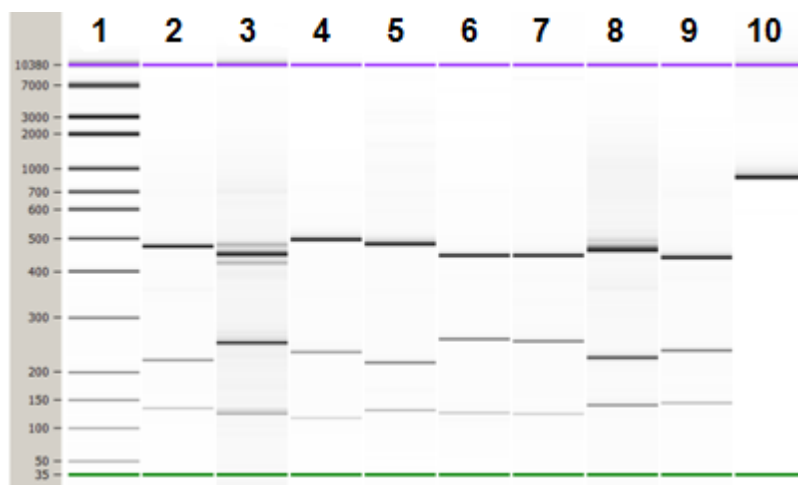


図 3 2100 バイオアナライザ解析による制限酵素処理の確認。左から DNA ladder、レーン 2-9 ECD 切断反応液 A-H、レーン 10: 未消化 Enrichment Control DNA。

Stopping Point 次のステップに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、32 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 2: 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。

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。

- 1 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。(オプション)制限酵素消化した各 ECD サンプルは Nuclease Free Water で 4 倍に希釈した方が、より正確なサイズで泳動できます。
- 2 *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 μ L の各 ECD サンプルを入れ、2 μ L 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 付属ボルテックスミキサ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。

- 3 *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 2200 TapeStation にセットします。に TapeStation 電気泳動結果の例を示します。

2. サンプルの調製

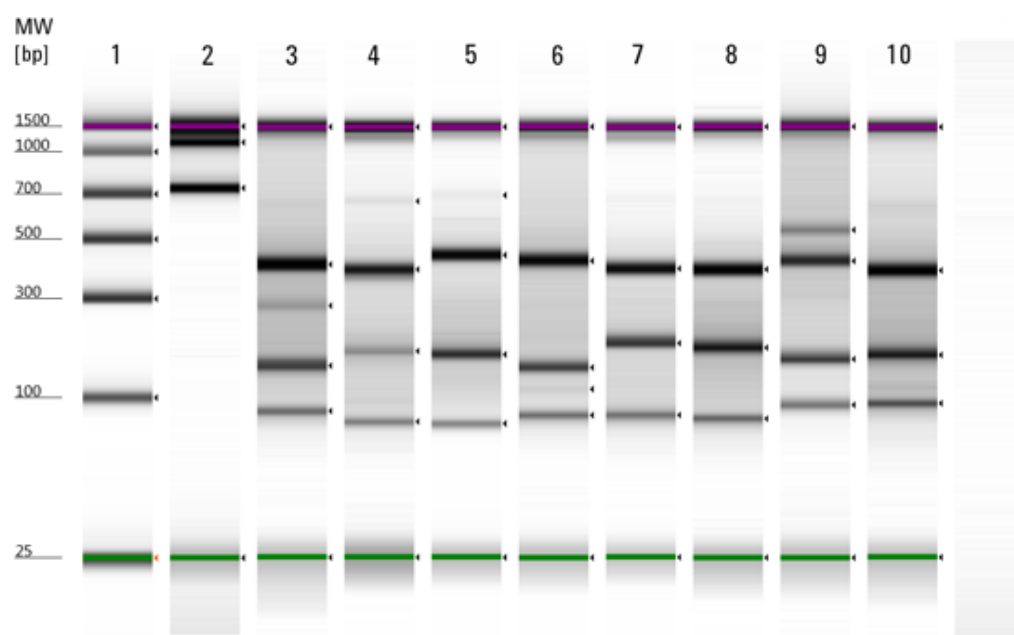


図 4 2200 TapeStation 解析での制限酵素処理の確認。

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℃ で長期保存ができます。この先、32 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 μ L の Enrichment Control DNA ストック溶液と 2 μ L 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 μ L の Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) を 4 μ L の ECD サンプルそれぞれに加えます。
- 5 μ L 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。

にゲル結果の例を示します。

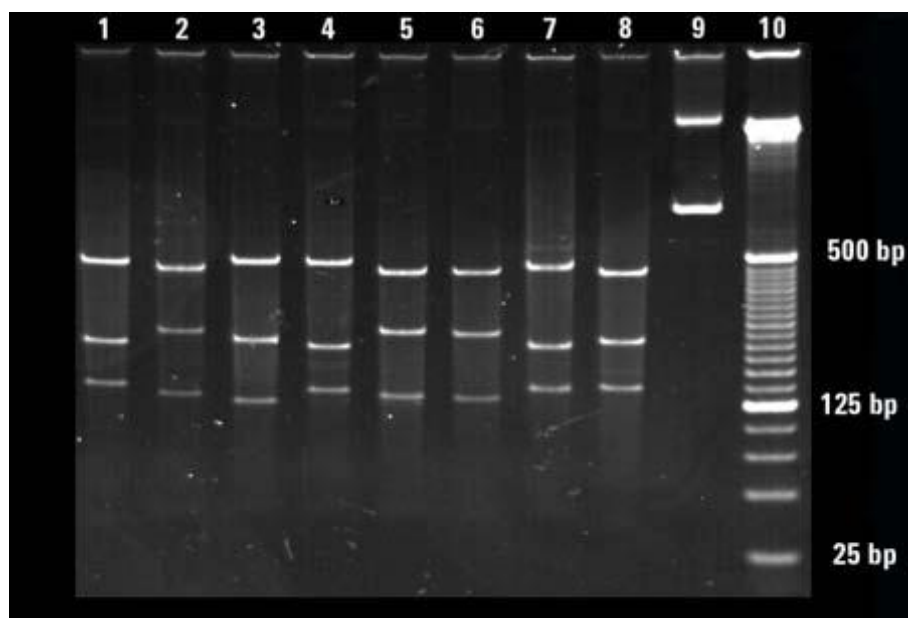


図 5 ゲル電気泳動での制限酵素処理の確認。

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

2. サンプルの調製

STEP2. HaloPlex 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 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。キットの Box 1 に入っている Certificate of Analysis にハイブリダイゼーション時間が 3 時間または 16 時間のどちらが適用になるか記載されています。Certificate of Analysis にハイブリダイゼーション時間が記載されていない場合は、30 ページに記載の情報を参照してください。

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 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 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、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、51 ページ以降の HaloPlex Index の塩基配列を参照してください。HaloPlex 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攪拌し、スピンドウンします。

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	50 μ L	650 μ L
HaloPlex Probe	20 μ L	260 μ L
Total Volume	70 μ L	910 μ L

- 2 70 μ L 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。

CAUTION

このプロトコルには、**Indexing Primer Cassette** について、2 種類の異なるセットについて記載しています。**実験を始める前に、必ずお手元のキットの内容を確認し、本プロトコルに記載のセットに関する情報のうち、適切な方を参照してください。**

Indexing Primer Cassette が白色キャップのチューブ (16 反応キット)、もしくは青色プレート (48 反応キット、96 反応キット) に入っている場合 (2014 年 12 月以降に納品されたキット)、キットには A01 から H12 の 8-bp index が含まれています。サンプルに Index をアサインする際は、p55 から p56 に記載の Indexing Primer Cassette 配置および配列情報を参照してください。

Indexing Primer Cassette が透明キャップのチューブ (16 反応キット)、もしくは透明プレート (48 反応キット、96 反応キット) に入っている場合 (2014 年 11 月以前に納品されたキット)、キットには 1 から 96 の 8-bp index が含まれます。サンプルに Index をアサインする際は、p59 から p65 に記載の Indexing Primer Cassette 配置および配列情報を参照してください。

- 3 10 μ L の適切な **Indexing Primer Cassette** 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、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 Indexing Primer Cassette を使用してください。チューブに加えた Indexing Primer Cassette 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 80 μ L 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	70 μ L
<u>Index Primer Cassette いずれか 1 種</u>	<u>10 μL</u>
計	80 μ L

2. サンプルの調製

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 well 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 well 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ゆきます。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。

マルチチャンネルピペットを使い、まず A 行の制限酵素消化済み DNA サンプルを 10 μ L とり、70 μ L のハイブリダイゼーションマスターミックスと 10 μ L の Indexing Primer Cassette 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PETTING でよく混ぜます。

次に B 行のサンプルを 10 μ L 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。

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 128 μ L、サンプルで約 160 μ L 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	70 μ L	70 μ L
Index Primer Cassette いずれか 1 種	10 μ L	10 μ L
制限酵素処理サンプル	48 μ L	80 μ L
計	128 μ L	160 μ L

2. サンプルの調製

ECD サンプルについては、1 well ずつハイブリダイゼーション反応チューブに移した後で、**32 μ L 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。

- 70 μ L Hybridization Master Mix
- 10 μ L indexing Primer Cassette
- 合計約 80 μ L 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 well からの回収量が 10 μ L 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、スピンドウンします。

2. サンプルの調製

- 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。

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(3 時間あるいは 16 時間)よりも長時間 54°C でインキュベーションしないでください。

表 6 HaloPlex 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)		
		Disease Research Panels (ClearSeq AML, Cancer Research or Cardiomyopathy Research)	Custom Designs with <20,000 probes (see Certificate of Analysis) [†]	Custom Designs with >20,000 probes (see Certificate of Analysis) [‡]
Step 1	95°C	10 minutes	10 minutes	10 minutes
Step 2	54°C	3 hours	3 hours	16 hours

* 160 µL の反応液量を設定できない場合、設定可能な最大値を入れてください。SureCycler を使用する場合は、100 µL に設定します。

† 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、54°C で 3 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 3 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 54°C 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 160 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。

STEP3. 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 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 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、室温にしておきます。
 - -20°C の box から **Capture Solution**、**Wash Solution**、**Ligation Solution**、および **SSC 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。
 - +4°C の冷蔵庫から **HaloPlex Magnetic Beads** を取り出します。
- 2 後の PCR 反応で使用する 2M の酢酸をサンプルあたり 0.5 uL（＋余剰分）用意します。2M 酢酸は高品質のものを使い、2M 以上の濃度の酢酸から希釈する場合は濃度を間違えないようにご注意ください。

CAUTION

このステップで使用する 2 M Acetic acid の濃度が正しくないと、50 mM NaOH で溶出した反応液との中和ができず、PCR 反応が阻害される可能性があります。
実験に必要な試薬リスト中の、2 M Acetic acid (Sigma A8976)の使用を推奨します。

参考情報 ナカライテスク Acetic Acid, Molecular biology grade (08885-45)の場合の希釈計算

比重 1.05 g/ml, 純度 99.7%、Acetic Acid 分子量 60.05 より、
モル濃度は $1000 \times 1.05 \times 0.997 / 60.05 = 17.43 \text{ M}$

- 3 33 ページの DNA 溶出ステップで使用する 50 mM NaOH をサンプルあたり 25 μL（＋余剰分）調製します。
50 mM NaOH 溶液は、10 M 以上の NaOH ストック溶液から用時調製してください。

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。
・50 mM 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。

2. サンプルの調製

- 4 キットに含まれる **HaloPlex Magnetic Beads** をボルテックスミキサで激しく撹拌します。HaloPlex Magnetic Beads 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撹拌してください。

- 5 キャプチャ反応のため、以下の手順でハイブリダイゼーションサンプルあたり 40 μL (+余剰分) の **HaloPlex Magnetic Beads** を調製します。

- a 下表にしたがって、ビーズ懸濁液を 1.5 mL チューブにうつします。

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 Capture Solution の容量を調節してください。40 μL $\times$ (サンプル(reaction)数 +1) で計算します。

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 12 Reactions (includes excess)
HaloPlex Magnetic 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、透明な上澄み液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。1 容量 (12 サンプル/回の場合 520 μL) の **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)
Capture Solution	40 μL	520 μL

- 6 ハイブリダイゼーション反応溶液をサーマルサイクラーから取り出し、すぐに、40 μL の調製したビーズ懸濁液を 160 μL のハイブリダイゼーション反応液にそれぞれ加えます。この反応液をキャプチャ反応液と呼びます。

NOTE

ビーズをハイブリダイゼ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。

- 7 磁性ビーズを加えた後、100 μL ピペットの目盛りを 80 μL にセットし、キャプチャ反応液を 15 回ピペッティングで撹拌します。

- 8 キャプチャ反応液を室温で 15 分間インキュベートします。

- 9 スピンダウンした後、チューブを Agencourt SPRIPlate Super Magnet マグネットプレートに移しま

す。

NOTE

以降の PCR チューブやストリップチューブのサンプルの磁性ビーズを集めるステップでは、Agencourt SPRIPlate Super Magnet マグネットプレートまたは日本ジェネティクス FG-SSMAG2 を使用してください。

- 10 溶液が透明になるまで(約 30 秒)待ち、その後ピペットを 200 μ L にセットし、上清を取り除きます。
- 11 ビーズに結合したサンプルを洗浄します。
 - a キャプチャ反応チューブをマグネットプレートから取り出し、100 μ L の **Wash Solution** をそれぞれのチューブに加えます。
 - b 100 μ L のマルチチャンネルピペットを 80 μ L 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。
 - c キャプチャ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、46°C で 10 分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**。この間に、次のステップで使用する DNA ライゲーションマスターミックスを準備しておきます(次ページをご参照ください)。
 - d キャプチャ反応チューブを室温でスピンドウンし、チューブをマグネットプレートに移します。
 - e 溶液が透明になるまで(約 30 秒)待ち、その後ピペットを 120 μ L にセットし、注意して上清を取り除きます。必要があれば、チューブに残った上清を 20 μ L 容量のピペットで注意して取り除きます。

2. サンプルの調製

STEP4. キャプチャした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 ライゲースをキャプチャ反応液に加え、キャプチャした環状化ターゲット DNA と、HaloPlex Indexing Primer Cassette のニックを閉じます。

- 1 下の表 7 の試薬を混ぜ合わせて **DNA ライゲーションマスターミックス** を調製します。穏やかなボルトックスで試薬をよく混ぜ、チューブをスピンドウンします。

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)
Ligation Solution	47.5 μ L	617.5 μ L
DNA Ligase	2.5 μ L	32.5 μ L
Total Volume	50 μ L	650 μ L

- 2 キャプチャ反応チューブをマグネットプレートから取り出し、50 μ L の **DNA ライゲーションマスターミックス** を各 DNA キャプチャ反応チューブのビーズに加えます。以後、このチューブをライゲーション反応チューブと呼びます。
- 3 100 μ L のマルチチャンネルピペットを 40 μ L にセットしたものを使用し、ビーズを 15 回のピペッティングでよく混ぜます。
- 4 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の後に 4°C Hold のステップを加えることもできます。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 PCR マスターミックスを調製しておきます。

STEP5. PCR マスターミックスの調製

このステップでは、ページのキャプチャしたターゲット DNA 増幅ステップのために PCR マスターミックスを調製します。

CAUTION

PCR マスターミックスに指定量の 2M Acetic Acid を含めることで、次のステップで 50 mM NaOH により溶出される反応液が中和されます。このため、正確な濃度の 2M Acetic Acid を使用することが非常に重要です。

- 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	16.1 µL	209.3 µL
5X Herculase II Reaction Buffer *	10 µL	130 µL
dNTPs (100 mM, 25 mM for each dNTP) *	0.4 µL	5.2 µL
Primer 1 (25 µM)	1 µL	13 µL
Primer 2 (25 µM)	1 µL	13 µL
2 M Acetic acid ++	0.5 µL	6.5 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase *	1 µL	13 µL
Total	30 µL	390 µL

* Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent p/n 600677 または 600679)に含まれます

++ キットには含まれません。あらかじめ調製したものを使用します。

- 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、新しい 0.2 mL のチューブに **30 µL** ずつ分注します。8 連チューブ、96 ウェルプレート of のいずれでもかまいません。
- 3 チューブは、36 ページの「STEP7. 溶出したターゲット DNA の PCR 増幅」で使用するまで氷上に置いておきます。

2. サンプルの調製

STEP6. キャプチャした DNA の NaOH での溶出

10 分間のライゲーション反応の時間が終わったら、以下のステップを進めてキャプチャした DNA ライブラリの溶出を行います。

CAUTION

このステップでは、高品質の NaOH 溶液を使用することが、DNA の溶出・回収率に非常に重要です。

- ・使用する 50 mM NaOH は用時調製してください。
- ・50 mM NaOH を用時調製する際に、10N 未満の濃度で保存されていたストック溶液を使用しないでください。
- ・50 mM NaOH を入れた容器は、使用しない際はキャップ・シールをし、50 mM NaOH を長時間空気にさらさないでください。とくにサンプル数が多い場合にご注意ください。

- 1 ライゲーション反応チューブをスピンドウンし、チューブをマグネットプレートに移します。
- 2 溶液が透明になるまで(約 30 秒)待ち、その後ピペットを 50 μ L にセットしたものを使用し、注意して上清を取り除きます。
- 3 ライゲーション反応チューブをマグネットプレートから取り出します。キットに含まれる 100 μ L の **SSC Buffer** を各チューブに加えます。
- 4 100 μ L のマルチチャンネルピペットを 80 μ L 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完全に再懸濁させます。
- 5 ライゲーション反応チューブをスピンドウンし、マグネットプレートに移します。
- 6 30 秒待ってビーズを沈澱させ、120 μ L にセットしたピペットを使用して SSC Buffer を取り除きます。必要があれば、残った液体を 20 μ L 容量のピペットで注意して取り除きます。
- 7 マグネットプレートからチューブを取り出し、25 μ L の **50 mM NaOH** (30 ページで用時調製したもの)を各チューブに加えます。
- 8 100 μ L のマルチチャンネルピペットを 15 μ L 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完全に再懸濁させます。
- 9 1 分室温でインキュベートし、キャプチャされた DNA を溶出させます。
- 10 チューブをスピンドウンし、マグネットプレートに移します。
次のセクションの PCR 増幅にすぐに進んでください。

STEP7. 溶出したターゲット DNA の PCR 増幅

- 1 マグネットプレート上の各チューブから上清 20 μ L を、Step 5 で調製し氷上に置いてある PCR Master Mix に移し、増幅反応を準備します。
- 2 PCR 反応チューブにキャップをした上で、穏やかにボルテックスして混合し、スピンドウンします。
- 3 PCR 反応チューブをサーマルサイクラーにセットし、表 9 のプログラムを実行します。Hot Top は使用します。この段階で次に使用する AMPure XP ビーズを室温に戻しておくと共に、使用する分の 70%エタノールと、10 mM Tris-HCl (pH. 8.0)または 10 mM Tris-acetate (pH. 8.0) を準備しておく と便利です。

最適な増幅サイクル数はカスタム HaloPlex プローブのデザインにより異なります。お使いのカスタムプローブに推奨される PCR サイクル数については、HaloPlex Target Enrichment System Box 1 に付属している Certificate of Analysis に記載されています。デザインによって PCR サイクル数は異なりますので、この紙を捨てずに保存するようにしてください。

表 9 HaloPlex 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

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、PCR 産物は-20°C で 72 時間または 8°C 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。

2. サンプルの調製

STEP8. 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°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 **40 µL** の PCR 反応サンプルを新しい 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、トラブルシューティングに使用します。
- 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、Vortex の最高回転数で溶液をよく攪拌し続けます。
- 8 チューブをスピンドア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。
- 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 10 mM Tris-acetate または 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加えます。**市販の 1 M 溶液を購入している場合は、必ず希釈して使用します。**

NOTE

サンプルの溶出には、室温の 10 mM Tris-acetate または 10 mM Tris-HCl buffer を使用します。

- 16 100 μ L ピペットを 30 μ L 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 μ L)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。

2. サンプルの調製

STEP9. 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(41 ページ参照)または 2200 TapeStation (43 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。アンプリコンは 50 から 500 bp のターゲット DNA インサートと 125 bp のシーケンシングモチーフから構成されています。



図 6 HaloPlex 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)、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 175 bp から 625 bp の範囲となり、大部分のアンプリコンは 225 bp から 525 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。

- 1 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 μ L のライブラリサンプルを解析に使用してください。
- 2 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。
- 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 525 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。150 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 125 bp 付近に大きなピークが出ることがあります。125 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ケンスは得られません。125 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 Step 8 の 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 μ L を使用して Step 8 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。

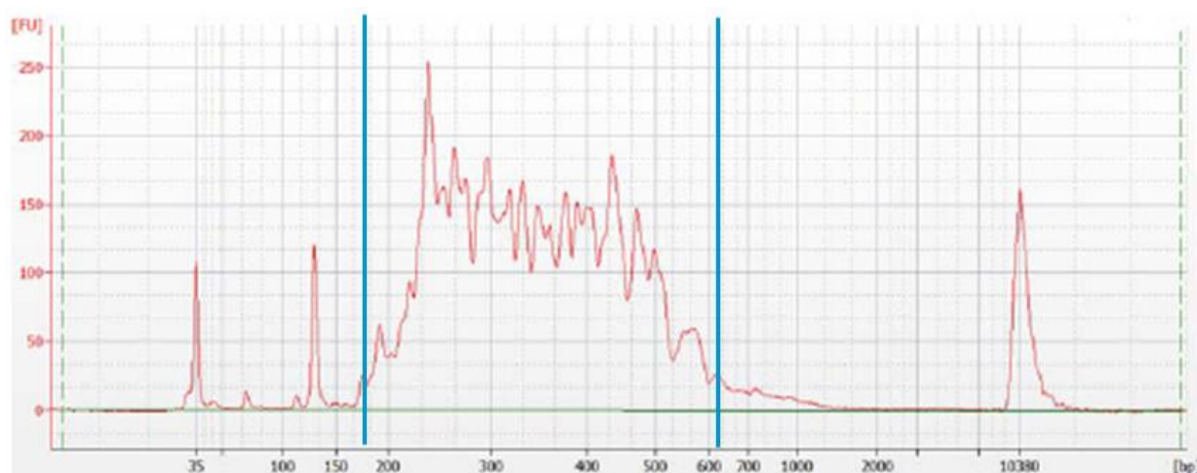


図 7 2100 バイオアナライザ解析による HaloPlex エンリッチメントの確認

2. サンプルの調製

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 ボルテックスミキサーで混合します。

オプション 2: 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、*2200 TapeStation User Manual* を参照してください。

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。

- 1 *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 μ L のライブラリサンプルをそれぞれ入れ、2 μ L 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 $\times$ 2 回、確実に混合してください。

- 2 *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 2200 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。

2. サンプルの調製

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 525 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。150 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/uL 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 125 bp 付近に大きなピークが出ることがあります。125 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ケンスは得られません。125 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 Step 8 の 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 μ L を使用して Step 8 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。

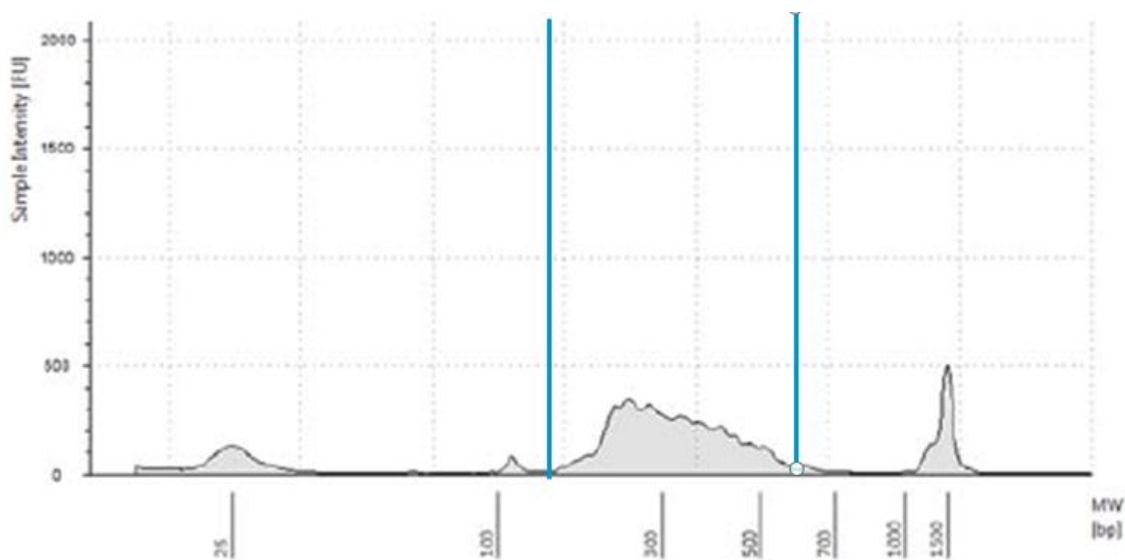


図 8 2200 TapeStation 解析での HaloPlex エンリッチメントの確認。

STEP10. 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 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、または GAIIx 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（下）、および HiSeq プラットフォーム（45 ページ）についての追加ガイドラインを参照してください。
- 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。
- シーケンシングランは 8-nt インデックスリードで行われるように設定する必要があります。インデックス配列の全情報については、51 ページ以降の表を参照してください。
- 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。

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 20uL、10nM の濃度）にするには Low TE を用います。

2. サンプルの調製

表 10 トータル量 20uL 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。

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

Illumina Experiment Manager (IEM)ソフトウェアを使用して、下記ガイドラインに従ってカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成したら、インデックス配列を HaloPlex のインデックス配列にマニュアルで変更する必要があります。HaloPlex のインデックス配列については 51 ページからをご参照ください。

Sample Sheet のセッティング

- IEM ソフトウェアで、下記の手順で MiSeq プラットフォームの Sample Sheet を作成します。
 - Category から *Others* を選択
 - Application から *FASTQ Only* を選択

- 2 **Workflow Parameters** スクリーンで下記スクリーンショットに従いパラメータを選択します。

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

FASTQ Only Run Settings

Reagent Cartridge Barcode* MSXXXXXXX-300

Sample Prep Kit **TruSeq LT**

Index Reads ☐ 0 ☒ **1** ☐ 2

Project Name Test Project

Experiment Name Test Experiment

Investigator Name Test

Description Test

Date 9/ 6/2012

Read Type ☒ **Paired End** ☐ Single Read

Cycles Read 1 **151**

Cycles Read 2 **151**

* - required field

FASTQ Only Workflow-Specific Settings

☐ Custom Primer for Read 1

☐ Custom Primer for Index

☐ Custom Primer for Read 2

☐ Use Adapter Trimming

- 3 **Sample Plate Wizard** を使用して、各サンプルの情報を入力します。TruSeq LT Assay Plate テーブルの Index 1(17)カラムには、各サンプルにイルミナの 17 インデックスのいずれかを割り当てます。Indexは後のステップで HaloPlex のインデックスに変更します。

Sample Plate Wizard - Plate Samples

TruSeq LT Assay Plate

Table Plate Plate Graphic indicates invalid samples

	Sample ID*	Sample Name	Index1 (17)*	Sample Project	Description
A01	1	Sample1	A001	ProjectX	Tumor
A02	2	Sample2	A002	ProjectX	Normal
A03	3	Sample3	A003	ProjectX	Tumor

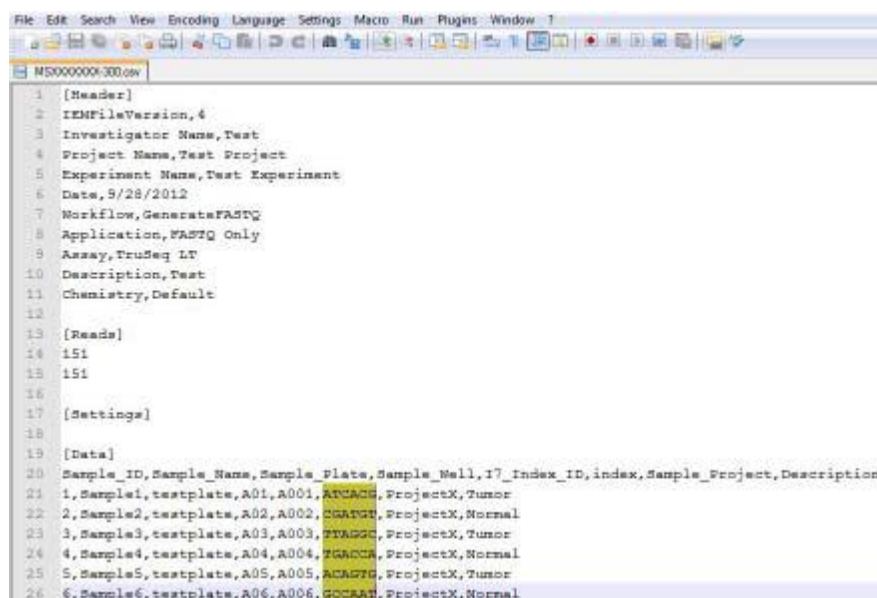
- 4 Sample plate セットアップタスクを終了し、sample plate file を保存します。
- 5 **Sample Sheet Wizard** を使用して、ランに含めるサンプルを選択し、Sample Sheet file を保存し

2. サンプルの調製

ます。

HaloPlex インデックスを含めるための Sample Sheet の編集

- 1 Sample Sheet ファイルをテキストエディタで開きます。それぞれのサンプルについて、6 bp のインデックス配列 (下図でハイライトされた部分) を適切な HaloPlex 8 bp インデックス配列に変更します。



```
1 [Header]
2 IEMFileVersion,4
3 Investigator Name,Test
4 Project Name,Test Project
5 Experiment Name,Test Experiment
6 Date,9/28/2012
7 Workflow,GenerateFASTQ
8 Application,FASTQ Only
9 Assay,TruSeq LT
10 Description,Test
11 Chemistry,Default
12
13 [Reads]
14 i5i
15 i5i
16
17 [Settings]
18
19 [Data]
20 Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,Sample_Project,Description
21 1,Sample1,testplate,A01,A001,ATCAGG,ProjectX,Tumor
22 2,Sample2,testplate,A02,A002,CGAGGT,ProjectX,Normal
23 3,Sample3,testplate,A03,A003,TTAGGG,ProjectX,Tumor
24 4,Sample4,testplate,A04,A004,TTAGCC,ProjectX,Normal
25 5,Sample5,testplate,A05,A005,ACGAGG,ProjectX,Tumor
26 6,Sample6,testplate,A06,A006,GCGAAG,ProjectX,Normal
```

- 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。

HiSeq 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

シーケンシングランを表 11 に示す Cycles 設定を使用して 8-nt インデックスリードを行うよう設定してください。サイクル数設定は、装置コントロールソフトウェアインターフェイスのインデックスタイプ選択ボタンから Custom を選択した後、Run Configuration スクリーンで指定できます。

表 11 HiSeq プラットフォーム Run Configuration スクリーン Cycle Number 設定

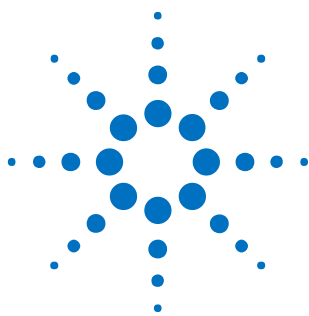
Run Segment	Cycle Number
Read 1	100
Index 1 (i7)	9
Index 2 (i5)	0
Read 2	100

* 設定は v3.0 SBS ケミストリーに適用します。

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 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ケ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. リファレンス

新しい Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が青色プレートまたは白色キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧 53

HaloPlex Index の塩基配列 (青色プレートまたは白色キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette) 54

旧来の Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が透明プレートまたは透明キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧 55

HaloPlex Index の塩基配列 (透明プレートまたは透明キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette) 60

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。

CAUTION

このチャプターでは、**Indexing Primer Cassette** について、2 種類の異なるセットについて記載しています。**実験を始める前に、必ずお手元のキットの内容を確認し、本プロトコルに記載のセットに関する情報のうち、適切な方を参照してください。**

最初のセクションでは、Indexing Primer Cassette の並び順を再構成したキット (2014 年 12 月以降に納品されたキット) に関する情報を記載しています。Indexing Primer Cassette は A01 から H12 となり、48 反応キットと 96 反応キットについては青色プレート、16 反応キットについては白色キャップのチューブに入っています。詳細は p55 から p56 をご参照ください。

次のセクションでは、Indexing Primer Cassette の並び順が発売当初の順であるものの (2014 年 11 月以前に納品されたキット) に関する情報を記載しています。Indexing Primer Cassette は 1 から 96 となり、48 反応キットと 96 反応キットについては透明プレート、16 反応キットについては透明キャップのチューブに入っています。詳しくは p59 から p65 を参照してください。



新しい Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が青色プレートまたは白色キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧

HaloPlex Target Enrichment System 試薬キットは、4°C 保存品、-20°C 保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管ください。

お手元のキットの Indexing Primer Cassette が透明プレートまたは透明キャップのチューブに入っている場合は p54 を参照してください。

表 12 HaloPlex Target Enrichment Kit 構成試薬一覧- 2014 年 12 月以降に納品された
下記の部品番号のキット

Design Type	Reaction Number	HaloPlex Target Enrichment System-ILM, Box 1 [*]	HaloPlex Magnetic Beads Box 2
		Store at -20°C	Store at +4°C
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST	48 Reactions	5190-8044 OR 5190-8045 ^{††}	5190-5976
	96 Reactions	5190-8050 OR 5190-8051 [†]	5190-5386
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM	48 Reactions	5190-8046 OR 5190-8047 [†]	5190-5976
	96 Reactions	5190-8052 OR 5190-8053 [†]	5190-5386
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM	48 Reactions	5190-8048 OR 5190-8049 [†]	5190-5976
	96 Reactions	5190-8054 OR 5190-8055 [†]	5190-5386
Cancer Research, ILM	16 Reactions	5190-8056	5190-5383
	96 Reactions	5190-8057	5190-5386
Cardiomyopathy Research, ILM	16 Reactions	5190-8058	5190-5383
	96 Reactions	5190-8059	5190-5386
ClearSeq AML, ILM	16 Reactions	5190-8086	5190-5383
	96 Reactions	5190-8087	5190-5386

* 含まれる試薬については、表 13 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 5190-8044, 5190-8050, 5190-8046, 5190-8052, 5190-8048, 5190-8054 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 5190-8045, 5190-8051, 5190-8047, 5190-8053, 5190-8049, 5190-8055 となります。

3. リファレンス

HaloPlex Target Enrichment System Box #1 の構成試薬を下の表に示します。

表 13 HaloPlex Target Enrichment System Box 1 の構成試薬(2014 年 12 月以降に納品で、表 12 記載の部品番号のキット)

Included Reagents	16 Reaction Kit	48 Reaction Kit	96 Reaction Kit
Hybridization Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Ligation Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Wash Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Capture Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
SSC Buffer	tube with clear cap	bottle	bottle
RE Buffer	tube with clear cap	bottle	bottle
BSA Solution	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
DNA Ligase	tube with red cap	tube with red cap	tube with red cap
Enrichment Control DNA	tube with orange cap	tube with orange cap	tube with orange cap
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
HaloPlex Indexing Primer Cassettes	16 tubes containing Indexing Primer Cassettes A01 to H02 (white-capped tubes)	96-well plate with Indexing Primer Cassettes A01 to H06 (blue plate)*	96-well plate with Indexing Primer Cassettes A01 to H12 (blue plate)†
Enzyme Strip 1	8-well strip tube with green label	8-well strip tube with green label	8-well strip tube with green label
Enzyme Strip 2	8-well strip tube with red label	8-well strip tube with red label	8-well strip tube with red label
HaloPlex or ClearSeq Probe	tube with pink cap	tube with pink cap	tube with pink cap

* 表 14 のプレートマップを参照してください。

† 表 15 のプレートマップを参照してください。

表 14 HaloPlex Indexing Primer Cassette A01 から H06 のプレートマップ: 48 反応キットで青色プレートにはいったもの、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 15 HaloPlex Indexing Primer Cassette A01 から H12 のプレートマップ: 96 反応キットで青色プレートにはいったもの)

	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

3. リファレンス

HaloPlex Index の塩基配列 (青色プレートまたは白色キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette)

各 HaloPlex 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。HaloPlex16 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。

表 16 HaloPlex の Index 配列: 青色プレートまたは白色キャップのチューブで供給される Indexing Primer Cassette に対応

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

旧来の Index 構成の試薬キット (Index Primer Cassette が透明プレートまたは透明キャップのチューブに入っているキット) に対応する試薬一覧

HaloPlex Target Enrichment System 試薬キットは、4°C 保存品、-20°C 保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管ください。

お手元のキットの Indexing Primer Cassette が青色プレートまたは白色キャップのチューブに入っている場合は p51 を参照してください。

表 17 HaloPlex Target Enrichment Kit 構成試薬一覧- 2014 年 12 月以前の納品で下記の部品番号のキット

Design Type	Reaction Number	HaloPlex Target Enrichment System-ILM, Box 1*	HaloPlex Magnetic Beads Box 2
		Store at -20°C	Store at +4°C
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST	48 Reactions	5190-5972 OR 5190-5974 ^{††}	5190-5976
	96 Reactions	5190-5385 OR 5190-5436 [‡]	5190-5386
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM	48 Reactions	5190-5977 OR 5190-5978 [‡]	5190-5976
	96 Reactions	5190-5534 OR 5190-5538 [‡]	5190-5386
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM	48 Reactions	5190-5981 OR 5190-5982 [‡]	5190-5976
	96 Reactions	5190-5536 OR 5190-5540 [‡]	5190-5386
Cancer Research, ILM	16 Reactions	5190-6234	5190-5383
	96 Reactions	5190-6236	5190-5386
Cardiomyopathy Research, ILM	16 Reactions	5190-6528	5190-5383
	96 Reactions	5190-6529	5190-5386
ClearSeq AML, ILM	16 Reactions	5190-7733	5190-5383
	96 Reactions	5190-7735	5190-5386

* 含まれる試薬については、表 18 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 5190-5972, 5190-5385, 5190-5977, 5190-5534, 5190-5981, 5190-5536 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 5190-5974, 5190-5436, 5190-5978, 5190-5538, 5190-5982, 5190-5540 となります。

3. リファレンス

表 18 HaloPlex Target Enrichment System Box 1 の構成試薬(2014 年 12 月以前に納品で表 17 に記載された部品番号のキット)

Included Reagents	16 Reaction Kit	48 Reaction Kit	96 Reaction Kit
Hybridization Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Ligation Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Wash Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
Capture Solution	tube with clear cap	bottle	bottle
SSC Buffer	tube with clear cap	bottle	bottle
RE Buffer	tube with clear cap	bottle	bottle
BSA Solution	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
DNA Ligase	tube with red cap	tube with red cap	tube with red cap
Enrichment Control DNA	tube with orange cap	tube with orange cap	tube with orange cap
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
HaloPlex Indexing Primer Cassettes	16 tubes containing Indexing Primer Cassettes 1-16 (clear-capped tubes)	96-well plate with Indexing Primer Cassettes 1-48 (clear plate)*	96-well plate with Indexing Primer Cassettes 1-96 (clear plate)†
Enzyme Strip 1	8-well strip tube with green label	8-well strip tube with green label	8-well strip tube with green label
Enzyme Strip 2	8-well strip tube with red label	8-well strip tube with red label	8-well strip tube with red label
HaloPlex or ClearSeq Probe	tube with pink cap	tube with pink cap	tube with pink cap

* 表 19 のプレートマップを参照してください。

† 表 20 のプレートマップを参照してください。

表 19 HaloPlex Indexing Primer Cassette 1 から 48 のプレートマップ: 48 反応キットで透明プレートにはいったもの、7-12 列は空ウェル)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	–	–	–	–	–	–
B	2	10	18	26	34	42	–	–	–	–	–	–
C	3	11	19	27	35	43	–	–	–	–	–	–
D	4	12	20	28	36	44	–	–	–	–	–	–
E	5	13	21	29	37	45	–	–	–	–	–	–
F	6	14	22	30	38	46	–	–	–	–	–	–
G	7	15	23	31	39	47	–	–	–	–	–	–
H	8	16	24	32	40	48	–	–	–	–	–	–

表 20 HaloPlex Indexing Primer Cassette 1 から 96 のプレートマップ: 96 反応キットで透明プレートにはいったもの)

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

3. リファレンス

HaloPlex Index の塩基配列 (透明プレートまたは透明キャップのチューブに入った Indexing Primer Cassette)

各 HaloPlex 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。HaloPlex 16 反応キットには、1-16 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、1-48 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、1 から 96 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。

表 21 HaloPlex Index 1-16

Index Number	Sequence
1	AACGTGAT
2	AAACATCG
3	ATGCCTAA
4	AGTGGTCA
5	ACCACTGT
6	ACATTGGC
7	CAGATCTG
8	CATCAAGT
9	CGCTGATC
10	ACAAGCTA
11	CTGTAGCC
12	AGTACAAG
13	AACAACCA
14	AACCGAGA
15	AACGCTTA
16	AAGACGGA

表 22 HaloPlex Index 17-32

Index Number	Sequence
17	AAGGTACA
18	ACACAGAA
19	ACAGCAGA
20	ACCTCCAA
21	ACGCTCGA
22	ACGTATCA
23	ACTATGCA
24	AGAGTCAA
25	AGATCGCA
26	AGCAGGAA
27	AGTCACTA
28	ATCCTGTA
29	ATTGAGGA
30	CAACCACA
31	CAAGACTA
32	CAATGGAA

3. リファレンス

表 23 HaloPlex Index 33-48

Index Number	Sequence
33	CACTTCGA
34	CAGCGTTA
35	CATACCAA
36	CCAGTTCA
37	CCGAAGTA
38	CCGTGAGA
39	CCTCCTGA
40	CGAACTTA
41	CGACTGGA
42	CGCATACA
43	CTCAATGA
44	CTGAGCCA
45	CTGGCATA
46	GAATCTGA
47	GACTAGTA
48	GAGCTGAA

表 24 HaloPlex Index 49-64

Index Number	Sequence
49	GATAGACA
50	GCCACATA
51	GCGAGTAA
52	GCTAACGA
53	GCTCGGTA
54	GGAGAACA
55	GGTGCGAA
56	GTACGCAA
57	GTCGTAGA
58	GTCTGTCA
59	GTGTTCTA
60	TAGGATGA
61	TATCAGCA
62	TCCGTCTA
63	TCTTCACA
64	TGAAGAGA

3. リファレンス

表 25 HaloPlex Index 65-80

Index Number	Sequence
65	TGGAACAA
66	TGGCTTCA
67	TGGTGGTA
68	TTCACGCA
69	AACTCACC
70	AAGAGATC
71	AAGGACAC
72	AATCCGTC
73	AATGTTGC
74	ACACGACC
75	ACAGATTC
76	AGATGTAC
77	AGCACCTC
78	AGCCATGC
79	AGGCTAAC
80	ATAGCGAC

表 26 HaloPlex Index 81-96

Index Number	Sequence
81	ATCATTCC
82	ATTGGCTC
83	CAAGGAGC
84	CACCTTAC
85	CCATCCTC
86	CCGACAAC
87	CCTAATCC
88	CCTCTATC
89	CGACACAC
90	CGGATTGC
91	CTAAGGTC
92	GAACAGGC
93	GACAGTGC
94	GAGTTAGC
95	GATGAATC
96	GCCAAGAC

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著作権は全て 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、万が一不審な点や誤り、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製、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。複製、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 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 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。