

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

# 和文プロトコル

Protocol Version E0 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 Automation Protocol for Illumina Sequencing Version E0, December 2014 G9900-90020

に対応しています。

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

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

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

email\_japan@agilent.com

#### 1. はじめに

この章では、実験を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. Agilent NGS 自動化システムを使用した HaloPlex ターゲットエンリッチメント

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

#### 3. サンプル調製

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

#### 4. Appendix

この章では、デザインによっては観察される可能性のある 125 bp のアダプターダイマーピーク について、除去するためのプロトコルを説明しています。

#### 5. 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 が白いキャップのチューブ(16 反応キット)、もしくは青いプレート (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、p96 から p97 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、p100 から p106 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.2 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。
- ・制限酵素マスターミックスの調製方法を更新しました。
- ・アダプターダイマー除去の必要がある場合に行う AMPure ビーズ精製ステップ(91 ページ.) 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 7

操作に関する注意 8 安全に関する注意 8 実験に必要な試薬 9 実験に必要な装置、消耗品類 11 サンプル QC に使用する装置、消耗品類 12 SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex 自動化を行うために追加で必要な部品 12

#### 2. Agilent NGS 自動化システムを使用した HaloPlex ターゲットエンリッチメント 13

Agilent NGS 自動化システムについて 14 HaloPlex ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要 26 自動化ランを行う上での実験条件の検討 28 自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所について 29 装置の設置について 29 実験の所要時間についての情報 29

#### 3. サンプルの調製 31

STEP1.gDNA の制限酵素処理による断片化 32 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 48 STEP3. ターゲット DNA のキャプチャと増幅 55 STEP4. 増幅したターゲットライブラリの精製 75 STEP5. ターゲットエンリッチメントの確認 80 オプション 1: 2100 バイオアナライザ解析による確認 81 オプション 2:2200 TapeStation 解析による確認 83 STEP6. 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 85

#### 4. Appendix 90

アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル 91

#### 5. リファレンス 93

新しい Index 構成の試薬キット(Indexing Primer Cassette が青色プレートに入っているキット)に対応 する試薬一覧 94 HaloPlex インデックスの塩基配列(青色プレートに入った Indexing Primer Cassette) 97

旧来の Index 構成の試薬キット(Indexing Primer Cassette が透明プレートに入っているキット)に対応する試薬一覧 98

HaloPlex インデックスの塩基配列(透明プレートに入った Indexing Primer Cassette) 101

各プロトコルで使用する消耗品 107

各プロトコルの初期設定温度 107

各プロトコルの所要時間 108

各プロトコル終了時のサンプルプレートの位置 108

HaloPlex Target Enrichment System Protocol



1. はじめに

操作に関する注意 8 安全に関する注意 8 実験に必要な試薬 9 実験に必要な装置、消耗品類 11 サンプル QC に使用する装置、消耗品類 12 SureSelect 対応の NGS 自動化システムで HaloPlex 自動化を行うために 追加で必要な部品 12

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE	このプロトコルは、Agilent NGS 自動化システムを使ってライブラリを調製するための ものです。マニュアルでサンプルを調製する場合には、別途、専用プロトコル (G9900-90001 の和訳版)を参照ください。
NOTE	HaloPlex ターゲットエンリッチメントキットを本プロトコルに記載されている以外の
	non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サ
	ポートも適用外となります点、ご了承ください。
NOTE	本キットにつきましては、他のマニュアル操作の製品と同様に、誤った使用法による
	実験の失敗については、補償の対象外となりますことをご了承ください。万一、自動
	化システムもしくは弊社試薬の不具合により、実験がうまくいかなかった場合は、弊
	社サポート担当にご連絡ください。連絡先はプロトコル末尾に記載されています。
NOTE	本プロトコルは、イルミナ社のマルチプレックスペアエンドライブラリ作製プロトコル
	と異なる点がありますのでご注意ください。
NOTE	ベックマン・コールター社製の精製ビーズについては、必ずベックマン・コールター社
	のユーザーズガイドをあわせて参照ください。



#### 1. はじめに

#### 操作に関する注意

- 本プロトコルは Agilent の HaloPlex Target Enrichment System キットに対応しています。
   G9906A, G9906B の HaloPlex Exome Taarget Enrichment System キットには対応していません。
- 96 反応キットは、3 カラム分のサンプル(24 サンプル)4 回分のマスターミックスを調製する場合には十分な試薬が含まれていますが、24 サンプル未満のサンプル数で実験していくと、試薬の一部が 96 反応分に足りなくなることがあります。
- 48 反応キットは、3 カラム分のサンプル(24 サンプル)2 回分のマスターミックスを調製する場合には十分な試薬が含まれていますが、24 サンプル未満のサンプル数で実験していくと、試薬の一部が 48 反応分に足りなくなることがあります。
- HaloPlex 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 3 ターゲット DNA のキャプチャと増幅 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。STEP4 増幅したターゲット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。
- 銀の Nunc DeepWell プレートインサートに Nunc DeepWell プレートをセットする場合には、プレートが浮きやすくなります。手でそっと押し下げて確実にセットするようにしてください。

#### 安全に関する注意

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

#### 実験に必要な試薬

下記の表は以下の 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

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量/96 反応あたり	内容量	備考
HaloPlex 試薬キット						
HaloPlex Target Enrichnment System Kit (以下から遺択してください)						
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, 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、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, 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	ザインIDと、納品さ	れたライブラリのデザイ	ンIDが同	同じであること	を確認してくだ	<b>さ</b> 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	110.5 uL	600677 - 200 反応分, 600679 - 400反応分	
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880 または A6 3881	指定	5760 uL	A63880 - 5 mL A63881 - 60 mL	
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit, Qubit 2.0 fluorometer用	Life Technologies	Q32850 またはQ32 853	指定		Q32850 - 100 assays, Q32853 - 500 assays	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約200 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				45 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)				2940 uL		1M以上のストック溶液から用時調製
1 M Tris-HCI, 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-HCI (pH 8.0)				15 mL		

※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。 1. はじめに

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存ください。

### 実験に必要な装置、消耗品類

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

#### http://agilentgenomics.jp

### サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

#### 表 2 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品書	指定/ 推奨/ 相当 旦	必要量	内容量	備考
Qubit 2.0 fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨			スタート時のgDNAを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)および G8820A (384 wellブロック)	相当			96ウェルタイプのサーマルサイクラー、100 uL以上の容量設定が可能なタイプ、およ び384ウェルタイプのサーマルサイクラー、 指定のプレートEppendorf twin tec full skired 384 well PCR plateが使用可能な機種。SureCyclerの場 合はプロックを2タイプ用意すれば本体は1 台で可。
Dynal DynaMag-2 または DynaMag-15	Life Technologies	123-21D (DynaMag- 2) 123-01D (DynaMag-15)	相当			1回あたりのサンプル数に応じてサイズを 選択。24サンプル/回の場合はDynaMag- 2, 48もしくは96サンプル/回はDYnaMag- 15
Robotic Pipetting Tips (250 uL)	Agilent	19477-022	指定			
Eppendorf twin tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	951020401	指定			
Eppendorf twin tec full-skirted 384-well PCR plates, blue	Eppendorf	951020737	指定			区別が容易なように青色タイプを指定して いますが、色違いも使用可能
Eppendorf twin tec half-skirted 96-well plates, blue	Eppendorf	951020362	指定			区別が容易なように青色タイプを指定して いますが、色違いも使用可能
Thermo Scientific Reservoirs	Thermo Scientific	1064156	指定			
Nunc Deep Well Plate, sterrile, 1.3 ml well volume	Thermo Scientific	260251	指定			
Axygen 96 Deep Well Plate, 2.0 mL, Square Well (Waste Reservoirs)	Axygen	P-2ML-SQ-C	指定			E&K Scientific p/n EK-2440でも可
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,P10	相当			
マルチチャンネルピペット	Eppendorf	0.5 - 10 uL, 10 - 100 uL	相当			制限酵素マスターミックスの作成に使用し ます。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-						
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。
卓上ブレート遠心機	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
アイスパケツ						
フユメー ボルテックスミキサー		+				
1977 770817	1	1	1	-		

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

#### 1. はじめに

品名

### 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

オプション1 バイオアナライザによる測定						
2100 Bioanalyzer	Agilent		指定			コントロールDNAの制限酵素処理結果の 確認および最終的なライブラリのサイズ・ 濃度の確認に用います。エキスパートソフ トウェアVer B02.07 以降が必要です
High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	10ラン	10ラン分	1ランで最大11サンブルまで流すことがで きます。エキスパートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です
オプション2 TapeStationによる測定						
2200 TapeStation System	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 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	7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	フラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガ ロースゲル電気泳動の代わりに使用でき ます。
オプション ゲル電気泳動による測定*						
Xcell SureLock Mini-Cell	Life Technologies	El0001	指定			
Novex 6% Polyacrylamide, TBE Pre-cast Gels	Life Technologies	EC62655BOX	指定	1ラン		
Novex TBE Running Buffer, 5x	Life Technologies	LC6675	指定			
Novex High-density TBE Aample Buffer, 5X	Life Technologies	LC6678	指定			
GelRed Nucleic Acid Stain, 3x in water	Biotium	41001	指定			
DNA molecular weight markers						一般的なもので可
UV-transilluminator						一般的なもので可

指定/ 必要量 内容量 備考

製造メーカー 品番

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

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

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

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

HaloPlex Target Enrichment System Protocol



## 2. Agilent NGS 自動化システムを使用した HaloPlex

ターゲットエンリッチメント

Agilent NGS 自動化システムについて 14 HaloPlex ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要 26 自動化ランを行う上での実験条件の検討 28 自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所につ いて 28 装置の設置について 28 実験の所要時間についての情報 28

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



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

#### Agilent NGS 自動化システムについて

#### Bravoプラットフォームについて

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

### CAUTION

はじめに、ご使用の Bravo プラットフォームの操作、メンテナンス、および安全上の注 意をよくお読みください。Bravo Platform User Guide (G5409-90004) および VWorks Software User Guide (G5415-90002) を参照してください。

#### Bravoプラットフォームデッキ

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



図 1 Bravo プラットフォームデッキ

#### 電源オン

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

#### 電源オフ

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

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

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

#### Bravoデッキヒートブロックの温度設定

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

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

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

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

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



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



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



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



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

#### チラーの温度設定

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

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



#### VWorks Automation Controlソフトウェア

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

NOTE

このマニュアルは、VWorks software version 11.0.1.1032 以降に対応しています。 VWorks のバージョンについてのご質問は、email\_japan@agilent.com までご連絡く ださい。

#### VWorksソフトウェアへのログイン

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



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

User Authentic	ation	
C	Please log in: User name: Password:	OK Cancel

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

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

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

制限されます。

Agilent Technologies

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

#### HaloPlex.VWFormを使用したランの設定と開始

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

- 1 デスクトップの HaloPlex.VWForm ショートカットを使ってこのフォームを開きます。
- 2 フォームの左上、Parameters の 1) Step と 2) Number of columns of samples のドロップダウンメ ニューから、適切な HaloPlex ワークフローステップとサンプルのカラム数を選択します。サンプルの カラム数は1つのカラムが 8 サンプルに対応しています。2 カラムは 16 サンプル、3 カラムは 24 サ ンプルとなり、最大 12 カラムとなります。
- 3 ランのパラメータを決定したら、3) Update layout and information をクリックします。

NOTE Update layout and information ボタンをクリックするまでは、表示されたプロトコル を実行することはできません。

4 フォームの中央 Bravo Deck Setup の部分には、上で決定したランパラメータに応じて必要となる 試薬と実験器具をセットする Bravo デッキの場所が示されます。セットする場所を間違えると、自動 化プロトコルは正常にランされませんので、本プロトコルを参照してセットした後に、フォーム上の一 表示で必ずダブルチェックするようにしてください。

**Agilent HaloPlex Automation** 

arameters	Bravo Deck Setup			Current Tip State	Na Man Loan
1) Step         03 Capture_v1.1.pro           2) Number of columns of samples         2	Empty deepwell plate forwaste (square wells)	New tip box	Wash Solution in 96 Eppendorf Twin.tec	Select columns of unus	ed tips (Box 2)
3) Update layout and information 4) Update current tip state	Hybridization plate on red insert 54°	HaloPlex Magnetic Beads in Nunc plate	Eppendorf Twin.tec half skirted plate on red insert 4°C	Reset	
atus Elapsed Time: 00:02:28		Empty tip box	Master Mixes in Nunc plate on silver insert	Reference Final DNA Location	Labware Needs
			0°C	Protocol Duration	Temperature Prese
Controls	Information It is okay to turn on the Turn on Thermocube to	a MTC to pre-heat position 9	on4 and pre-chill position	6 Ad	vanced Settings Enable audio alerts – Ignore all incubation times (testing only)

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



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

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

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

NOTE ラン開始時に Current Tip State の表示が Bravo デッキ2番と8番に存在するチッ プの配置と一致することが重要です。実際のチップの配置とソフトウェア上の設定が 異なると、正しく分注されずに実験が失敗します。また、クラッシュの原因にもなりま すので十分に確認してください。 新しいチップ・使用済みのチップともに場所がソフトウェア上で正確に設定されていれ ば、使いかけのチップボックスを HaloPlex 自動化プロトコルに使うことができます。

6 NGS 自動化システムが正しくセットアップされていることを確認したら、フォーム左下の Control セ クションにある Start をクリックしてランを開始します。 VWorks Control Toolbar にある Start ボタン を使わないでください。 ランは下図の HaloPlex. VWForm Form の Start ボタンを使って始めるよう にして下さい。



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

#### Bravoの初期化

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

1. 最初はグリッパーの初期化に伴うG axis のエラー表示が出ます。

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

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

2. 次にW-axisの初期化に伴うエラー表示が出ます。

Bravo - 1 Error

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

• Choose "Retry" to continue homing the W-axis.
• Choose "Abort" to cancel initialization.

Diagnostics

Retry
Ignore and Continue, leaving device in current state

Abort

Add to Error Library
...

このエラー表示が出たら、常時 Retry を選択してください。

#### シミュレーション設定の確認

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

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

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

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

#### Ignore All Incubation 設定の確認

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

実験を行う際には、チェックがはずれていることをご確認ください。

-Advanced Settings

Enable audio alerts

☐ Ignore all incubation times (testing only)

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

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

#### プロトコルの終了

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

Protoco	l complete!	$\mathbf{X}$			
?	Release stacker racks used in protocols?				
	Yes	No			

#### VWorksの終了

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

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



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



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

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

User Name	:	administrator
Pass word	:	administrator

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

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

#### HaloPlex ターゲットエンリッチメント 操作手順の概要

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

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

ワークフローステップ	- Agilent NGS 自動化システムで使用される VWorks プロ			
	トコル			
ゲノム DNA の制限酵素消化	Digestion.pro			
HaloPlex プローブとサンプル DNA のハイブリ	Hybridization.pro			
ダイゼーション				
濃縮したサンプルのキャプチャと増幅	Capture_v1.1.pro			
増幅したライブラリの精製	Purification_v1.1.pro			

表 6 ワークフローで使用される VWorks プロトコルの概要

1) gDNAを8ウェルに分注し、制限酵素消化を行います。



 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 ドをストレプトアビジン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 2 サンプル調製ワークフロー

#### 自動化ランを行う上での実験条件の検討

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

表 / カラム 致とサンフル 致の 対応	志表
----------------------	----

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

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

各 48 反応分のキットは、1 ランあたり 3 カラム(24 サンプル分)の実験を 2 回行うために必要な試薬量 を含んでいます。

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

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

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



ハイブリダイゼーション後のサンプルへのインデックスタグ付加のステップ(図 2)では、HaloPlex インデ ックスプライマーを別のプレートにセットする必要があります。実験デザインを立てる際に、適切な番号の インデックスプライマーを適切なウェル(サンプル)にそれぞれ割り当てるようにしてください。HaloPlex ターゲットエンリッチメント システムで使用する 96 種類のインデックスの塩基配列については、 Reference の HaloPlex Index の塩基配列を参照してください。

#### 装置の設置について

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

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

#### 実験の所要時間についての情報

実験を始める前にキットの 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。

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

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。 HaloPlex.VWForm でサンプル数ごとの所要時間を確認できるので、ハイブリダイゼーションのステップ がオーバーナイトとなるように計算して制限酵素処理を始める時間を決めてください。 HaloPlex Target Enrichment System Protocol

## 3. サンプルの調製

STEP1. gDNA の制限酵素処理による断片化 32 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 48 STEP3. ターゲット DNA のキャプチャと増幅 55 STEP4. 増幅したターゲットライブラリの精製 75 STEP5. ターゲットエンリッチメントの確認 80 STEP6. 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 85

この章では、Agilent 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、イルミナプラットフォームでシーケンス解析を行うことができるライブラリを調製する方法を 説明しています。gDNA サンプル 1 つにつき、ターゲット領域が濃縮され、インデックスタグが付加さ れたライブラリが 1 つ調製されます。

カスタムデザインの場合、ターゲット領域は1kb-5Mbの範囲となります。キット購入前にオンラインのSureDesign (www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474)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 ターゲットエンリッチメント システムでは、数千のターゲット DNA が同じ反応液中で増幅 され、その過程でイルミナペアエンドシーケンシングに必要なモチーフも取り込まれます。 ハイブリダ イゼーションとそれに続く過程で、各サンプルに異なるインデックスタグが付加されるので、シーケン シングの1レーンに 96 サンプルまでプールして解析することが可能です。

HaloPlexを用いた操作の概略は図2をご覧ください。



#### 3. サンプルの調製

#### STEP1.gDNAの制限酵素処理による断片化

このステップでは、gDNA サンプルを8種類の異なる制限酵素反応液中(それぞれ2種類の制限酵素を 含む、合計 16種類の制限酵素)で断片化することで、gDNA 制限酵素断片ライブラリを作製します。16 種類の制限酵素は、8連チューブ2本に入った状態でキットに含まれます。2本の8連チューブは緑色 マーカー、赤色マーカーで区別することが可能です。緑チューブ、赤チューブの対応する制限酵素同士 を合わせることで、8種類の異なる制限酵素マスターミックスを作成します。その後に各 gDNA サンプル と合わせることで制限酵素反応を行います。

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、 <u>http://www.genomics.agilent.com</u> 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。

#### 自動化システムの準備

- 1 NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく 拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が、使用する 96 プレート類に直接か からないようにご注意ください。
- 2 Bravo デッキ4番と9番の上に、赤いアルミニウムインサートをのせます。
- 3 チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーには少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。
- **4** 384 ウェルアダプターを Bravo デッキ 6 番に置きます。
- 5 Bravo デッキ4番と6番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで4℃に設定し ます(「Bravo デッキヒートブロックの温度設定」を参照してください)。Bravo デッキ4番と6番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンでそれぞれ CPAC 21 と CPAC 22に相当します。
- NOTE 39ページの制限酵素消化のインキュベーションでは、384 ウェルタイプのサーマルサ イクラーを使用します。SureCycler を使用する場合は、384 ウェルブロックがセットさ れていることを確認してください。サーマルサイクラーの加熱時間を短縮するために、 あらかじめ制限酵素消化に使うプログラムを 384 ウェルタイプのサーマルサイクラー に入力して開始し、自動化システムで制限酵素反応プレートを移すよう指示が出るま でのあいだ、プログラムを一時停止しておくと便利です。37°Cのインキュベーションセ グメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してください。39ページのス テップ 14 でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時停止を解除してくだ さい。

#### DNAサンプルソースプレートの準備

- NOTE
   HaloPlex 自動化ターゲットエンリッチメントシステムのランでは、プレートの 1、2、3、

   4、6、または 12 カラムが選択できます。試薬キットは 3、6、または 12 カラムで使用した際に過不足ない容量になっています。使用するカラムの全ウェルに DNA サンプルを入れてください。
- Qubit dsDNA BR Assay キットまたは PicoGreen 染色キットを用いて、gDNA サンプルの濃度を測定します。

それぞれのキットのマニュアルにしたがってください。

2 ランで使用する DNA サンプルプレートを準備します。フルスカートの 96 ウェル Eppendorf プレート にキット付属の Enrichment Control DNA (ECD) 1 サンプルと、23 サンプル(3 カラムラン)、47 サ ンプル(6 カラムラン)、または 95 サンプル(12 カラムラン)の gDNA サンプルを下記に従って入れま

#### 3. サンプルの調製

- す。
- a フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートのウェル A1 に ECD を 45 µL 分注します。氷上に 置きます。
- b 同じフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートの別のウェルに gDNA サンプル 225 ng を nuclease-free water で 45 µL の容量になるように調製して入れます。gDNA の終濃度は 5 ng/µL となります。gDNA サンプルは 96 ウェルプレートにカラム単位でセットし、A1 に入れた ECD につづいて B1 から H1 へ、次に A2 から H2 へ、最後に A12 から H12 という順番でセッ トするようにします。3 カラムランの場合の例を下に示します。gDNA を入れたフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートは氷上に置きます。



#### REマスターミックスソースプレートの準備

Restriction Enzyme Master Mix Strip を調製します。

このステップでは、2 種類の酵素(Green Enzyme Strip と Red Enzyme Strip)、Restiction Enzyme (RE) Buffer、および BSA を 8 連チューブの各ウェルで混ぜ合わせて 8 種類の Restriction Enzyme (RE)マスターミックスを調製します。図は 35 ページで説明している RE マスタ ーミックス Strip の調製法の、24 サンプル(3 カラムラン)の場合の作業の概要を示しています。実際 の調製は p33 からの操作手順に従って行ってください。3 カラムランの場合には RE マスターミック ス Strip を 8 連チューブに作ることができます。6 カラム、12 カラムの場合は、1.5 ml チューブ 8 本 を使って作ります。



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

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

Reagengs	Volume for 12						
	1 Library	1 Column	2 Columns	3 Columns	4 Columns	6 Columna	Columns
RE Buffer	34 µL	440 µL	760 µL	1080 µL	1360 µL	2160 µL	4320 µL
BSA Solution	0.85 µL	11 µL	19 µL	27 µL	34 µL	54 µL	108 µL
Total Volume	34.85 μL	451 μL	789 μL	2007 μL	1394 µL	2214 μL	4428 µL
2 表 9に従って、8連チューブもしくは 8本の 1.5 ml チューブに 1 で調製した RE buffer/ BSA 混合 液を使用するカラム数に応じた量を分注します。8連チューブの場合は、A の位置がはっきりわかる ようにチューブにマークをつけます。8本の 1.5 ml チューブを使用する場合、各チューブに A から H までの記号をつけます。この 8連チューブもしくは 1.5 ml チューブを RE マスターミックスチューブと 呼びます。

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

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

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
RE Buffer + BSA	4.0	54.4 µL	88 µL	128 µL	160 µL	256 µL	512 µL
Enzyme Strip 1 (green marker) enzyme A–H	0.5	6.8 µL	11 µL	16 µL	20 µL	32 µL	64 µL
Enzyme Strip 2 (red marker) enzyme A–H	0.5	6.8 µL	11 µL	16 µL	20 µL	32 µL	64 µL
Total Volume for each Master Mix A, B, C, D, E, F, G, or H	5 µL	68 µL	110 µL	160 µL	200 µL	320 µL	640 µL

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

3 穏やかにボルテックスで混ぜ、スピンダウンします。氷上におきます。

NOTE 1から4カラムランの場合、REマスターミックスAからHは0.2mLの8連ストリッ プチューブにマルチチャンネルピペットを使ってGreen Enzyme StripおよびRed Enzyme Strip から液を移してREマスターミックスストリップを調製することができま す。Aの位置がはっきりわかるように、チューブにマークをつけてください。6または 12カラムランの場合、マスターミックスは1.5mLチューブで調製してください。

#### RE マスターミックスソースプレートの調製

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

Master Mix Volume of Master Mix added per Well of Source Plate Position on Source Solution Plate 1-Column 2-Column 3-Column 4-Column 6-Column 12-Column Runs Runs Runs Runs Runs Runs RE Master Mix A Column 1 (A1-H1) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL RE Master Mix B Column 2 (A2-H2) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL **RE Master Mix C** Column 3 (A3-H3) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL RE Master Mix D Column 4 (A4-H4) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL RE Master Mix E Column 5 (A5-H5) 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL 7.3 µL 12.7 µL **RE Master Mix F** Column 6 (A6-H6) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL **RE Master Mix G** Column 7 (A7-H7) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL RE Master Mix H Column 8 (A8-H8) 7.3 µL 12.7 µL 18.0 µL 23.3 µL 33.9 µL 68.4 µL

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



図 3 自動化プロトコル Digestion.pro 用 RE マスターミックスソースプレートの準備

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

- 1 デスクトップの HaloPlex.VWForm ショートカットを使って HaloPlex セットアップフォームを開きます。
- 2 VWorks ソフトウェアにログインします。
- 3 セットアップフォーム左上、Parameters の 1) Step から 01 Digestion.pro を選択します。

Paramete	ITS				
1) Step	01 Digestion.pro	Z			
2) Number of columns of samples					
3)	Update layout and information				
4) Update current tip state					

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

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

このステップでは、最初にデッキにセットした以外にチップを下記の数量使用します。

	3 カラム	6 カラム	12 カラム
チップボックス	2	4	8

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

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

9 確認できたら Start をクリックしてランを開始します。ランを開始するとエラーが表示されます。詳細 は 22 ページを参照してください。



NOTE ランを開始しても自動化システムの装置が反応せず、動作が Log に記録されている 場合、VWorks がシミュレーションモードで実行していないことを確認してください。詳 細については 23 ページを参照してください。 10 下に示すように VWorks によってダイアログボックスが表示されたら、2番のチップボックスを新しい チップボックスと交換し、8番の使用済みチップボックスを空のチップボックスと交換してください。チ ップボックスを交換したら、フォームの Current Tip State の Reset をクリックしてください。チップの 状態がアップデートされたことを確認したら、下に示すダイアログボックスの Continue をクリックし てください。

3カラムランの場合、開始後およそ15-18分で最初のチップ交換ダイアログが出ます。

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

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

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

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

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

す。

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

- 12 ダイアログボックスで示された Bravo デッキの位置から、384 ウェルプレートを取り出します。
- PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでサンプルプレートをシールします。設定は 165°C、
  3.0 秒です。 プレートをスピンダウンし、溶液をウェルの底に集めます。
- 14 シールしたプレートを予熱した 384 ウェルタイプのサーマルサイクラーにセットし、表 12 のプログラムを実行します。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。プレートをセットしたらダイアログボックスのContinue をクリックします。

表 12 HaloPlex 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

制限酵素処理プレートの調製には、1枚あたりおよそ30-45分かかります。

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

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

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

#### 表 13 電気泳動用に取り分ける、制限酵素処理された各 ECD の位置

- b 8連 PCR チューブにキャップをして、4 µL のサンプルをサーマルサイクラーにセットして、80°C
  で 5 分間加熱し、制限酵素を失活させます。
- c 2100 バイオアナライザ(45ページ参照)、2200 TapeStation (46ページ参照)、またはゲル電気泳動(47ページ参照)で、調製した ECD 計 9 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 由来のスメアバンドが観察され、その上に約 125、225、 および 450 bp 付近の 3 つの主要なバンドが重なります。これらの 3 つのバンドは 800 bp の PCR 産物 に由来する制限酵素消化断片に相当し、8 種類の RE マスターミックスで切断した後の正確なサイズは、 それぞれ異なります。

# NOTE

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

ありますが、結果には影響しません。

### オプション1: 2100バイオアナライザ解析による確認

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

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

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

 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10

 10380

 3000

 3000

 100

 300

 300

 300

 300

 100

 100

 300

 300

 100
 -</

図 4 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。

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

Stopping Point次のステップにすぐに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、75 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 Tape Station User Manual を参照してください。

- 新しいチューブに1 uL の Enrichment Control DNA ストック溶液と1 uL の nuclease free water
  を混ぜ合わせて未消化 ECD コントロールを調製します。
- 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 High Sensitivity D1000 Sample Buffer を混ぜたサン プルは、TapeStation 付属のボルテックスミキサでプロトコルに指定の時間、付属の ボルテックスミキサをお持ちでない場合は、最高速度に設定して 10 秒間 x2 回、確実 に混合してください。
- 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。
  図 5 に TapeStation 電気泳動結果の例を示します。



- 図 5 2200 TapeStation 解析での制限酵素処理の確認。レーン 1: TapeStation D1000 High-Sensitivity Ladder、レーン 2:未消化 Enrichment Control DNA、レーン 3 – 10:制限 酵素消化された ECD A – H。
- Stopping Point次のステップにすぐに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、75 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

## オプション3:ゲル電気泳動による確認

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

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



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

**Stopping Point** 次のステップにすぐに進まない場合、-20°C で長期保存ができます。この先、75 ページの PCR 増幅ステップまで stopping point はありません。

## 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。

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、Reference 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。

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 が青色プレートに入っている場合、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、p96 からp97 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 が透明プレートに入っている場合、キットには 1 から 96 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、p100 から p106 に記載の Indexing Primer Cassette 配置及び配列情報を参照してください。

実験操作としてはどちらの Index Primer Cassette を使用する場合も同じです。

#### 自動化システムの準備

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

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

NOTE 54 ページのハイブリダイゼーションで使用するサーマルサイクラーの加熱時間を短縮するために、あらかじめ 96 ウェルタイプのサーマルサイクラーにハイブリダイゼーションプログラムを入力して開始し、後でプレートを移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利です。95°Cのインキュベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してください。54 ページのステップ 11 でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時停止を解除してください。

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

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

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

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
HaloPlex Probe	20 µL	255 µL	425 µL	595 µL	765 µL	1105 µL	2210 µL
Hybridization Solution	50 µL	637.5 µL	1062.5 µL	1487.5 µL	1912.5 µL	2762.5 µL	5525 µL
Total Volume	70 µL	892.5 µL	1487.5 µL	2082.5 µL	2677.5 µL	3867.5 µL	7735 µL

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

Master Mix Po Solution So	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc DeepWell Source Plate					
	Source Plate	1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12- Column Runs
Hybridization Master Mix	Column 1 (A1-H1)	102.8 µL	177.2 µL	251.6 µL	325.9 µL	474.7 μL	958.1 µL



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

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。

> 青色プレートに入った Indexing Primer Cassette に関する情報は p96 を参照してく ださい。 透明プレートに入った Indexing Primer Cassette に関する情報は p100 を参照してく ださい。

実験操作としてはどちらの Index Primer Cassette を使用する場合も同じです。

1 ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレート(青)の、インデックスを付加しようとしているサンプル に相当するウェル位置に、10 µL の適切な Indexing Primer Cassette を入れます。プレートは氷上 に置きます。

それぞれのウェルには Indexing Primer Cassette を1種類だけいれます。マルチプレックスで同時 にシーケンスするサンプルにはそれぞれ異なる番号の Indexing Primer Cassette を使用してくださ い。各ウェルに加えた 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。

このプレートをハイブリダイゼーション反応プレートと呼びます。

2 ECD コントロールサンプルは電気泳動での確認に使用した分、ボリュームが減っているので、1 で Indexing Primer Cassete を入れたハイブリダイゼーション反応プレートのウェル A1 に nuclease-free water を 32 µL 加えます(ウェル A1 には上のステップ 1 から 10 µL の Indexing Primer Cassette を含むはずです)。

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

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

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

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

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

## 7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



このステップでは、最初にデッキにセットした以外にチップを下記の数量使用します。

	3 カラム	6 カラム	12 カラム
チップボックス	0	0	1

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

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



- 9 PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでサンプルプレートをシールします。設定は 165℃、
  3.0 秒です。
- 10 プレートをスピンダウンします。

11 シールしたプレートを96 ウェルタイプのサーマルサイクラーにセットし、表 17 のハイブリダイゼーションプログラムを実行します。プローブ数により、Step 2 の時間が異なります。Certificate of Analysis で Step 2 の時間を確認してください。プレートをセットしたらダイアログボックスの Continue をクリックし、プロトコルを完了させます。

Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。表 17 のプログラムの実行後に低温で Hold しないようにご 注意ください。また、規定のハイブリダイゼーション時間(3 時間あるいは 16 時間)よりも長時間 54℃でインキュベーションしないでください。

表 17 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)	Time (Duration of Step)						
		Disease Research Panels (ClearSeq AML, Cancer Research or Cardiomyopathy Research)	Custom Designs with <20,000 probes (see Certificate of Analysis) <sup>†</sup>	Custom Designs with >20,000 probes (see Certificate of Analysis) <sup>‡</sup>					
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℃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℃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 uL 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 ul 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 のキャプチャと増幅

このステップでは、ビオチン化された HaloPlex プローブと環状化ターゲット 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。キャプチャ後 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 インデックスプライマーカセットのニックを閉じ、ターゲット DNA を溶出し、PCR で増幅します。

 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、1N 以下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。

#### ランのための試薬の準備

- 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。
- プロトコルの DNA 溶出セグメントで使用する用時調製した 50 mM NaOH をサンプルあたり 30 µL (+余剰分)調製します。

50 mM NaOH 溶液は、1N 以上の NaOH ストック溶液から用時調製してください。50 mM NaOH を 入れた容器は、使用しない際はキャップ・シールをしてください。

| Volume for |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 Library  | 1 Column   | 2 Columns  | 3 Columns  | 4 Columns  | 6 Columns  | 12 Columns |
| 30 µL      | 270 µL     | 510 µL     | 750 µL     | 990 µL     | 1470 µL    | 2940 µL    |

#### 表 18 必要な 50 mM NaOH 溶液の量

- 59 ページのプロトコルの PCR マスターミックス調製に使用する 2M の酢酸をサンプルあたり 0.5 uL (+余剰分)調製します。2M 酢酸は分子生物学用のグレードのものを使用し、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 2M 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、2M 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 1000x1.05X0.997/60.05 = 17.43 M

### 自動化システムの準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 銀色の Nunc プレートインサートを Bravo デッキ9番にセットします。
- 3 チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに は少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。
- 4 赤いインサートを Bravo デッキ 4 番にセットします。
- 5 Bravo デッキ4番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで54℃に設定しますす。 Bravo デッキ4番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 21 に相当します。 「Bravo デッキヒートブロックの温度設定」を参照してください
- 6 もうひとつの赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。
- 7 Bravo デッキ 6 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4℃ に設定します。 Bravo デッキ 6 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2.2 に相当します。

#### HaloPlex Magnetic Beadsソースプレートの調製

- 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 磁性ビーズを洗浄します。
  - a 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 表 19 にしたがって、1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルにうつします。

#### 表 19 キャプチャのための HaloPlex Magnetic Bead 懸濁液の量

Reagent	Volume for						
	1 Library	1 Column	2 Columns	3 Columns	4 Columns	6 Columns	12 Columns
HaloPlex Magnetic Beads	0.04 mL	0.36 mL	0.68 mL	1.0 mL	1.32 mL	1.96 mL	3.92 mL

- **b** 1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルを適切な磁石スタンドに5分間置きます。
- c 溶液が透明になったことを確認したら、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み 液をピペットで取り除きます。
- d 1.5 mL チューブまたはコニカルバイアルを磁石スタンドから取り出します。表 20 に従って Capture Solution をビーズに加え、ピペッティングで再懸濁させます。

表 20 ビーズ懸濁液に加える Capture Solution の量

Reagent	Volume for						
	1 Library	1 Column	2 Columns	3 Columns	4 Columns	6 Columns	12 Columns
Capture Solution	0.04 mL	0.36 mL	0.68 mL	1.0 mL	1.32 mL	1.96 mL	3.92 mL

- 3 Capture Solution に懸濁した HaloPlex ストレプトアビジンビーズを Nunc DeepWell ソースプレート に分注します。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという 順番で、40 µL の均一なビーズ懸濁液を加えます。プレートの底に気泡が入っていないことを目視 で確認します。
- 4 ストレプトアビジンソースプレートを Bravo デッキ5番に置きます。
- 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。

## 洗浄および溶出溶液ソースプレートの調製

フルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを使って表 21 の 3 種類のソースプレートを準備します。使用 するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、各溶液をフルスカ ート 96 ウェル Eppendorf プレートに入れてください。

- Wash Solution と書いたフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを準備します。使用する各ウェ ルに 110 μL の Wash Solution を加えます。
- SSC Buffer と書いたフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを準備します。使用する各ウェルに 110 µL の SSC Buffer を加えます。
- 3 50 mM NaOH と書いたフルスカート 96 ウェル Eppendorf プレートを準備します。使用する各ウェル に 30 µL の 50 mM NaOH を加えます。PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールしま す。設定は 165°C、1.0 秒です。72 ページのステップ 14 で Bravo デッキにプレートをセットするよう に指示があるまでシールしておいてください。

表 21	Capture	v1.1.pro	プロトコル	ノ用溶液ソ	ースプレ-	ートの準備
------	---------	----------	-------	-------	-------	-------

Solution	Volume to dispense per well of source plate
Wash Solution	110 µL
SSC Buffer	110 µL
50 mM NaOH	30 µL

Capture\_v1.1.proプロトコルのためのマスターミックスの調製

表 22 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。
 穏やかにボルテックスした後、チューブをスピンダウンします。

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
5X Herculase II Reaction Buffer	10 µL	127.5 µL	212.5 µL	297.5 µL	382.5 μL	552.5 µL	1105 µL
dNTPs (100 mM)*	0.4 µL	5.1 µL	8.5 µL	11.9 µL	15.3 µL	22.1 µL	44.2 µL
Primer 1	1 µL	12.75 µL	21.3 µL	29.8 µL	38.3 µL	55.3 µL	110.5 µL
Primer 2	1 µL	12.75 µL	21.3 µL	29.8 µL	38.3 µL	55.3 µL	110.5 µL
2 M Acetic acid	0.5 µL	6.4 µL	10.6 µL	14.9 µL	19.1 µL	27.6 µL	55.3 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL	12.75 µL	21.3 µL	29.8 µL	38.3 µL	55.3 µL	110.5 µL
Nuclease-free water	16.1 µL	205.3 µL	342.1 µL	479 µL	615.8 µL	889.5 µL	1779 µL
Total Volume	30 µL	382.5 µL	637.6 µL	892.7 µL	1147.6 µL	1657.6 µL	3315 µL

表 22 Capture\_v1.1.pro 用 PCR マスターミックスの調製

\* Herculase II Fusion Enzyme with dNTPs (Agilent p/n 600677 または 600679)に付属の

dNTP(100 mM、各ヌクレオチド 25 mM)を使用していることを確認してください。

# Capture\_v1.1.pro用マスターミックスソースプレートの調製

Hybridization.pro ランに使用した同じ Nunc DeepWell プレートを使用し、Capture\_v1.1.pro 用のマスタ ーミックスソースプレートを調製します。表 23 に示す量の PCR マスターミックスを Nunc DeepWell プレ ートのカラム 3 の全てのウェルに加えます。

# 表 23 Capture\_v1.1.pro 用のマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Position Solution Source	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate						
	Source Plate	1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs	
PCR Master Mix	Column 3 (A3-H3)	44.1 µL	75.9 µL	107.8 µL	139.7 µL	203.4 µL	410.6 µL	



2 表 24 に従って、適切な量のライゲーションマスターミックスを調製します。 穏やかにボルテックスした後、チューブをスピンダウンします。マスターミックスは、67 ページで使用 するまで氷上に置いておきます。ライゲーションマスターミックスは Capture\_v1.1.pro プロトコルで 使用するタイミングの直前にマスターミックスソースプレートに加えます。ランを開始する前にこのマ スターミックスをソースプレートに加えないでください。

表 24 Capture\_v1.1.pro 用ライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Ligation Solution	47.5 µL	605.6 µL	1009 µL	1413 µL	1817 µL	2624 µL	5249 µL
DNA Ligase	2.5 µL	31.9 µL	53.1 µL	74.4 µL	95.6 µL	138.1 µL	276.3 µL
Total Volume	50 µL	637.5 µL	1062.1 µL	1487.4 µL	1912.6 µL	2762.1 µL	5525.3 µL

NOTE

マスターミックスソースプレートのカラム 2 はこのステップでは空になっている必要が あります。Capture\_v1.1.pro プロトコル実行中の適切な時に、ライゲーションマスタ ーミックスをカラム 2 に加えるよう指示するダイアログボックスが現れます。カラム 1 は既に Hybridization.pro プロトコルで使用しています。 新しい DeepWell プレートを Capture\_v1.1.pro マスターミックスソースプレートに使用 する場合には、カラム 1 と 2 を空にしておき、PCR マスターミックスを新しいプレート のカラム 3 に加えるようにしてください。

# Agilent NGS 自動化システムの準備とCapture\_v1.1.pro VWorksプロトコルの実行

- 1 VWorks HaloPlex フォーム上の 1) Step で 03 Capture\_v1,1.pro を選択します。
- 2 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- 3 3) Update layout and information をクリックします。
- 4 表 25 に従って Bravo デッキの準備をします。
  - 表 25 Capture\_v1.1.pro 用 Bravo デッキの初期構成

デッキの位置	
1	空の廃液リザーバー(Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
2	新しいチップボックス
3	Wash Solution ソースプレート(フルスカート 96 ウェル Eppendorf)
4	ハイブリダイゼーションを行ったサンプルを含むプレート( <b>ハーフスカート</b>
	96 ウェル Eppendorf(青))、赤いインサートに載せる
5	HaloPlex マグネットビーズソースプレート(Nunc Deep Well)
6	新しいハーフスカート 96 ウェル Eppendorf(青)、赤いインサートに載せる
7	空き
8	空のチップボックス
9	マスターミックスソースプレート(Nunc Deep Well)、シルバーインサートに
	載せる

# このステップでは、最初にデッキにセットした以外にチップおよびプレートを下記の数量使用します。

	3 カラム	6 カラム	12 カラム
チップボックス	2	4	9
Nunc Deep Well プレート	1	1	1
ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf(青)	2	2	2

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

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

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

7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



NGS 自動化システムはストレプトアビジンビーズ上にターゲット DNA-HaloPlex プローブハイブリッドを キャプチャするための分注操作を行います。

NOTE 65ページの洗浄プログラムで使用する96ウェルタイプのサーマルサイクラーの余熱 時間を短縮するために、ここで洗浄プログラムを入力して開始し、後で反応プレートを 移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利です。46°Cのインキュ ベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してください。65 ページのステップ8でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時停止を解 除してください。

下に示すダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ 4 番のハイブリダイゼーションプレートを取り 出して廃棄してください。プロトコルの洗浄ステップで使う新しいハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プ レート(青)を Bravo デッキ 4 番にセットしてください。プレートをセットしたら Continue をクリックします。

Replace plate	
Remove and discard the hybridization plate from position 4. Replace with a fresh 96 Eppendorf twin.tec half skirted plate.	
When finished, dick Continue below.	
User data entry:	
Pause and Diagnose Continue	

このメッセージ以降、数分おきにプレート交換やサーマルサイクラーへの移動があります。

# 8 自動化システムによるキャプチャ洗浄プレートの準備が終わったら、下に示すダイアログボックス表示されます。

Transfer plate to thermal cycler		
Get plate from position 4, seal at 165C for 3.0s.		
Place in thermal cycler and run the wash program outlined in User Guide.		
Replace the plate at position 3 with the SSC Buffer source plate. Replace the Nunc plate at position 5 with a fresh Nunc plate.		
When finished, dick Continue below.		
User data entry:		
I		
Pause and Diagnose		

- a 4 番からサンプルプレート(ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレート(青))を取り出し、 PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールします。設定は 165°C、3.0 秒です。
- b シールしたプレートをサーマルサイクラーにセットし、表 26 に示す洗浄プログラムを実行します。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。サーマルサイクラーのプログラムに 10 分のインキ ユ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。

## 表 26 Capture.pro 洗浄ステップ用サーマルサイクラープログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	46°C	10 minutes

- ・ サーマルサイクラーのプログラムをスタートした後すぐ、Bravo デッキ3番の Wash Solution プレートを取り出し、廃棄します。プロトコルのライゲーションセグメントで使用する SSC Buffer ソースプレートを3番に置きます。
- d Bravo デッキ5番のビーズソースプレートを取り出し、廃棄します。新しい Nunc DeepWell プレ ートを5番に置きます。
- 全てのステップが完了したら、VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックして自動化プロトコルを再開します。プロトコルを再開するためにサーマルサイクラーの洗浄プログラムが終わるのを待つ必要はありません。

9 サーマルサイクラーでサンプルプレートを 10 分間インキュベートしている間に、下に示すようにライ ゲーションマスターミックスをマスターミックスソースプレートに加えるよう指示するダイアログボック スが表示されます。

Add Ligation Master Mi	x
Add the appropriate am master mix for the numl processed to column 2 o mix plate at position 9.	ount of ligation ber of columns of the Nunc master
When finished, click Cor	ntinue below.
User data entry:	
1	
Pause and Diagnose	Continue

表 27 に示された量のライゲーションマスターミックスを Bravo デッキ 9 番の Nunc DeepWell マスターミックスのカラム 2 の全てのウェルに加えます。

表 27 Capture.pro 用マスターミックスソースプレートへのライゲーションマスターミックスの分注

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

NOTE

9番のマスターミックスソースプレートには既に、カラム3にPCRマスターミックス、カ ラム1に使いきった Hybridization.pro プロトコルのハイブリダイゼーションマスターミ ックスが含まれます。このステップでは、ライゲーションマスターミックスをソースプレ ートのカラム2に加えることを確認してください。



10 表 26 の洗浄プログラムが完了し、下に示すダイアログボックスが表示されたら、プレートをサーマ ルサイクラーから Bravo デッキ 4 番に移してください。注意してプレートのシールをとり、VWorks ダ イアログボックスで Continue をクリックして Capture\_v1.1.pro プロトコルを再開します。

Get plate from thermal cycler		
Once the wash program has finished, retrieve plate from thermal cycler and place at position 4.		
Unseal the plate, then click Continue below to resume the protocol.		
User data entry:		
Pause and Diagnose		

NGS 自動化システムはキャプチャしたターゲット DNA のライゲーションステップを行います。

NOTE 70 ページのライゲーションプログラムで使用する 96 ウェルタイプのサーマルサイクラ ーの加熱時間を短縮するために、ここでライゲーションプログラムを入力して開始し、 後で反応プレートを移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利で す。55°Cのインキュベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時 停止してください。70 ページのステップ 12 でプレートをサーマルサイクラーに移した ら、直ちに一時停止を解除してください。 **11** 下に示すダイアログボックスが表示されたら、4 番からプレートを取り出し、廃棄してください。ダイア ログボックスの Continue をクリックし、プロトコルを再開します。

Remove plate		
Remove and discard plate from position 4.		
when finished, click Con	Tunue below.	
User data entry:		
1		
Pause and Diagnose	Continue	
	3	

# **12** 自動化システムによってライゲーションプレートが調製されたら、下に示すダイアログボックスが表示されます。

Transfer plate to therm	al cycler			
Get plate from position 6, seal at 165C for 3.0s.				
Place in thermal cycler and run the ligation program outlined in User Guide.				
Replace the Nunc plate at position 5 with a fresh Nunc plate. Place a fresh 96 Eppendorf Twin.tec half skirted plate at position 6. When finished, dick Continue below.				
User data entry:				
Pause and Diagnose	Continue			

- a 6 番のサンプルプレート(ハーフスカート 96 ウェル Eppendorf(青))を取り出し、PlateLoc サー マルマイクロプレートシーラーでシールします。設定は 165℃、3.0 秒です。
- b シールしたプレートをサーマルサイクラーにセットし、表 28 に示すライゲーションプログラムを 実行します。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。

表 28 Capture\_v1.1.pro ライゲーションステップのサーマルサイクラープログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	55°C	10 minutes
Step 2	4°C	Hold

- c サーマルサイクラーのプログラムをスタートしたら、Bravo デッキ 5 番の Nunc DeepWell プレ ートを取り出し、廃棄します。プロトコルのライゲーション精製ステップで使うため、新しい Nunc DeepWell プレートを 5 番に置きます。
- d 続く PCR プロトコルステップで使うので、新しいハーフスカート 96 ウェル Eppendorf プレート (育)を 6 番に置きます。
- 全てのステップが完了したら、VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックし、自動化プロトコルを再開します。プロトコルを再開するためにサーマルサイクラーのライゲーションプログラムが終わるのを待つ必要はありません。

13 表 28 のライゲーションプログラムが終わり、下に示すダイアログボックスが表示されたら、プレート をサーマルサイクラーから Bravo デッキ 4 番に移してください。注意してプレートのシールをとり、 VWorksダイアログボックスの Continue をクリックして Capture\_v1.1.pro プロトコルを再開します。

Get plate from thermal	cycler
Once the ligation progra retrieve plate from then at postion 4.	am has finished, mal cycler and place
Unseal the plate, then on to resume the protocol.	lick Continue below
lleer data entrui	
User data entry:	
Pause and Diagnose	Continue

14 下に示す VWorks ダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ3番の SSC Buffer プレートを 取り出し、廃棄します。プロトコルの溶出ステップで使用する50 mM NaOH ソースプレートを3番に 置きます。ソースプレートのシールを注意してはがしたら、ダイアログボックスの Continue をクリッ クしてプロトコルを再開します。

Replace plate
Remove and discard the SSC Buffer plate from position 3.
Replace with the 50mM NaOH source plate.
Carefully unseal the NaOH plate, then click Continue below.
User data entry:
Pause and Diagnose

NGS 自動化システムはキャプチャしたターゲット DNA の溶出の分注ステップを終えてから、増幅のための PCR 反応液を調製します。

NOTE 73 ページの PCR プログラムで使用する 96 ウェルタイプのサーマルサイクラーの加 熱時間を短縮するために、ここで PCR プログラムを入力して開始し、後で反応プレー トを移すよう指示が出るまでプログラムを一時停止しておくと便利です。98℃のイン キュベーションセグメントが開始する前にサーマルサイクラーを一時停止してくださ い。73 ページのステップ 15 でプレートをサーマルサイクラーに移したら、直ちに一時 停止を解除してください。
15 自動化システムによって PCR 増幅反応液が調製されたら、下に示す VWorks ダイアログボックス が表示されます。



- a 6 番のサンプルプレートを取り出し、PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールしま す。設定は 165℃、3.0 秒です。
- b シールしたプレートをサーマルサイクラーにセットし、表 29 に示す PCR プログラムを実行します。Hot Top (加熱式の蓋)を使用します。
   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。

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

表 29 HaloPlex キャプチャ後 DNA 増幅 PCR プログラム

### 3. サンプルの調製

- c PCR プログラムをサーマルサイクラーで始めたら、VWorks ダイアログボックスの Continue を クリックして自動化プロトコルを終了します。
- d 次の PCR 産物精製に進む場合、Agencourt AMPure XPビーズを4℃の保存場所からあらか じめ出しておきます。増幅プログラムのラン中にビーズを室温にするようにします。
- Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、PCR 産物は-20°C で 72 時間まで、または 8°C で一晩保存ができますが、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。

#### STEP4. 増幅したターゲットライブラリの精製

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

#### 自動化システムと試薬の準備

- 前回使用した、デッキ上のプレートやインサートはすべて片付けます。NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Bravo デッキをやさしく拭いてください。
- 2 赤いインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。
- 3 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XPビーズ(4℃保存)を室温に戻しておくようにします。

AMPure XP ビーズは凍らさないようにして下さい。

- 4 室温になった AMPure ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- AMPure XP ビーズを含む Nunc DeepWell ソースプレートを調製します。各ウェルに 100 µL の均
   ーな AMPure XP ビーズを Nunc DeepWell プレートのウェルに入れます。
- 6 15 ml の Nuclease Free Water をいれた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- 7 15 mL のサンプル溶出 buffer(nuclease-free 10 mM Tris-acetate または Tris-HCI buffer (pH 8.0))
   を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。市販の1M 溶液を購入している場合は、必ず希釈して使用します。
- 8 45 mL の用時調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。

### 3. サンプルの調製

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

- 1 VWorks HaloPlex フォーム上の 1) Step で 04 Purification\_v1.1.pro を選択します。
- 2 処理するサンプルのカラム数を選択します。1、2、3、4、6、または 12 カラムから選択できます。
- 3) Update layout and information をクリックします。
- 4 表 30 に従って Bravo デッキの準備をします。
  - 表 30 Purification\_v1.1.pro 用 Bravo デッキ初期配置

デッキの位置	
1	空の廃液リザーバー(Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
2	新しいチップボックス
3	空のフルスカート 96 ウェル Eppendorf)
4	空き
5	AMPure ビーズをいれた Nunc Deep Well プレート
6	PCR 増幅したサンプル(ハーフスカート96 ウェル Eppendorf(青))、赤いイ
	ンサートに載せる
7	空き
8	空のチップボックス
9	Nuclease Free Water 15 ml をいれた Thermo Scientific Reservoir

このステップでは、最初にデッキにセットした以外にチップを下記の数量使用します。

	3 カラム	6 カラム	12 カラム
チップボックス	1	2	5

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

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

7 確認が終わったら Start をクリックしてランを開始してください。



### 3. サンプルの調製

8 次に示すダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ 9 番の Nuclease Free Water リザーバーを取り出し、70%エタノールリザーバーを Bravo デッキ 9 番にセットします。
 終わったら、VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックします。

F	Replace reservoir
	Remove the water reservoir from position 9.
	Place the ethanol reservoir at position 9.
	When finished, click Continue below.
	Pause and Diagnose

このメッセージはラン開始後およそ 15-20 分で表示されます。

6 カラムラン、12 カラムランの場合は、このメッセージに先立ってチップ交換のメッセージが開始後 10-12 分後に表示されます。 9 次に示すダイアログボックスが表示されたら、Bravo デッキ9番の70%エタノールリザーバーを取り
 出し、サンプル溶出バッファリザーバーを Bravo デッキ9番にセットします。
 終わったら、VWorks ダイアログボックスの Continue をクリックします。

Replace reservoir	
Remove the ethanol re 9.	servoir from position
Place the elution buffer 9.	r reservoir at position
When finished, click Co	ntinue below.
User data entry:	
I	
Pause and Diagnose	Continue

NGS 自動化システムはキャプチャしたターゲット DNA の溶出ステップを行います。

**10** 自動化システムによって溶出サンプルプレートが調製されたら、下に示す VWorks ダイアログボック スが表示されます。**Continue** をクリックし、プロトコルを終了します。

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

**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。

#### STEP5. 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(81ページ参照)または2200 TapeStation (83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 7 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。
- 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クエンスは 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 4 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 µL を使用して Appendix の AMPure 精製を行います。



図 8 にバイオアナライザ電気泳動結果の例を示します。



## 3. 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)を使用してください。

## 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。

- 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、DNAとHigh Sensitivity D1000 Sample Buffer を混ぜたサンプ ルは、TapeStation 付属のボルテックスミキサでプロトコルに指定の時間、付属のボ ルテックスミキサをお持ちでない場合、最高速度に設定して 10 秒間 x2 回、確実に混 合してください。
- **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。

- 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。
  - 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クエンスは 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 µL を使用して Appendix の AMPure 精製を行います。

図 9 に TapeStation 電気泳動結果の例を示します。



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

## STEP6. 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(85 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。リード長はカバレッジの最大到達度に影響するため、デザインレポートをチェ ック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される必要があります。インデックス配列の全情報については、Reference 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。

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 31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。

### 3. サンプルの調製

表	31	トータル量 20uL	にするための・	インデックスタ	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				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 82 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

#### 4. Appendix

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。

lumina Experiment M Sample Sheet	anager Wizard - Workflov	w Parameters
FASTQ Only Run Settings		FASTQ Only Workflow-Specific Settings
Reagent Catridge Barcod	e* MSX000000X-300	Custom Primer for Read 1
Sample Prep Kit	TruSeq LT	Custom Primer for Index
Index Reads	© 0 (• 1) © 2	Custom Primer for Read 2
Project Name Experiment Name	Test Project Test Experiment	Use Adapter Trimming
Investigator Name Description	Test Test	
Date	9/ 6/2012	
Read Type	Paired End  Single Read	
Cycles Read 1 Cycles Read 2		
* - required field		

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。

San	nple F	Plate W	izard -	Plate 3	Samples
Seq LT As	say Plate	hic			indicates invalid sample:
1	Sample ID*	Samela Nama	(Index 1 (IT)*)	Sample Project	Description
A01	1	Sample Name	4001	ProjectX	Tumor
A02	2	Sample2	A002	ProjectX	Normal
AN03 /	3	Sample <sup>2</sup>	4003	Project	Turne and A

- **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 ます。

### 3. サンプルの調製

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

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 が青色プレートに入っている場合、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、p96 からp97 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 が透明プレートに入っている場合、キットには 1 から 96 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、p100 から p106 に記載の Indexing Primer Cassette 配置及び配列情報を参照してください。

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。



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 32 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 32 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。



この章では、デザインによっては必要となる、125 bp のアダプターダイマー除去のための AMPure XP ビーズを用いたライブラリプールの精製方法について説明しています。このステップは、エンリッ チメント後のライブラリをバイオアナライザまたは TapeStation で分析した際に、125 bp のピークの モル濃度が全体の 10%を超えた場合にのみ実施します。

#### アダプターダイマー除去のための AMPure 精製プロトコル

このステップは、125 bp のアダプターダイマーピークがモル濃度で 10%を超える場合にのみ実施します。 ライブラリを適切な組み合わせで等モルずつプールし、そのうち 40 µL を AMPure XP ビーズを使用して 精製します。

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

- 1 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XPビーズ (4°C 保存)を室温に戻しておくようにします
- 2 1 サンプルあたり 400 µL(+余剰分)の 70%エタノールを調製します。step 10 で使用します。
- 3 バイオアナライザまたは TapeStation で測定した濃度に基づき、適切な数のライブラリを等モルず つプールします。各ライブラリプール 40 µL を新しい 0.2 mL チューブに移します。各サンプルの残り は-20°C で保存します。
- 4 AMPure ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- 5 別のチューブに、1 サンプルあたり、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 100 µL と、 Nuclease-free 水 40 uL の混合液を作り、均一な状態になるまでよく混ぜます。
- 6 前ステップで調製した AMPure XP ビーズと Nuclease-free 水の混合液 140 uL を、PCR 反応サン プル 40 µL が入ったチューブに加えます。チューブにキャップをして Vortex でよく攪拌します。この ビーズとサンプル量の比は、最適な精製結果を得るために重要です。
- 7 室温で5分間インキュベートします。このインキュベーションの間は、旋回もしくは回転運動するミキ サーかシェーカーを用いて、溶液の撹拌を続けるようにしてください。
- 8 チューブをスピンダウンして溶液を集めてから、マグネットプレートにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約5分間)
- 9 チューブをマグネットプレートにセットしたまま、100 µL ピペットを 100 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。

- 3. サンプルの調製 Appendix
- **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。

NOTE サンプルの溶出には、室温の Tris-acetete または Tris-HCI buffer を使用します。

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

HaloPlex Target Enrichment System Protocol



# 5. リファレンス

新しい Index 構成の試薬キット (Indexing Primer Cassette が青色プレートに 入っているキット) に対応する試薬一覧 94 HaloPlex インデックスの塩基配列 (青色プレートに入った Indexing Primer Cassette) 96 旧来の Index 構成の試薬キット (Indexing Primer Cassette が透明プレート に入っているキット) に対応する試薬一覧 98 HaloPlex インデックスの塩基配列 (透明プレートに入った Indexing Primer Cassette) 100 各プロトコルで使用する消耗品 107 各プロトコルの初期設定温度 107 各プロトコルの所要時間 108 各プロトコル終了時のサンプルプレートの位置 108

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、青 色プレートに入っています。詳細は p93 から p96 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、 透明プレートに入っています。詳しくは p97 から p105 を参照してください。



新しい Index 構成の試薬キット(Indexing Primer Cassette が青色プレートに入っている キット)に対応する試薬一覧

HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステム試薬キットは、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 が透明プレートに入っている場合は、p97 を参照してください。

表 33 HaloPlex ターゲットエンリッチメントキット構成試薬一覧 – 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	HaloPlex Target Enrichment System-ILM, Box 1 <sup>*</sup>	HaloPlex Magnetic Beads Box 2	
	Store at -20°C	Store at +4°C	
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST, 96 Reactions	5190-8050 <b>OR</b> 5190-8051 <sup>†</sup>	5190-5386	
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM, 96 Reactions	5190-8052 <b>OR</b> 5190-8053 <sup>†</sup>	5190-5386	
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM, 96 Reactions	5190-8054 <b>OR</b> 5190-8055 <sup>†</sup>	5190-5386	
Cancer Research, ILM, 96 Reactions	5190-8057	5190-5386	
Cardiomyopathy Research, ILM, 96 Reactions	5190-8059	5190-5386	
ClearSeq AML, ILM, 96 Reactions	5190-8087	5190-5386	

\* 含まれる試薬については、表 34 を参照してください。

カスタムキット 48 反応も自動化実験にお使いいただけます。

<sup>+</sup>1-500 kb のデザインでは、初回オーダーの場合に 5190-8050 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 5190-8051 となります。

\*501 kb – 2.5 Mb のデザインでは、初回オーダーの場合に 5190-8052 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 5190-8053 となります。

\*\* 2.6 – 5 Mb のデザインでは、初回オーダーの場合に 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 5190-8055 となります。

<sup>++</sup> HaloPlex Magnetic Beads を含みます。

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

表 34	HaloPlex Tar	rget Enrichment	System fo	r Illumina	Box	1(-20°C	保存)の内訳	(Indexing
Primer Ca	assette が青色	プレートに入った	キット)					

Included Reagents	Format
Hybridization Solution	bottle
Ligation Solution	bottle
Wash Solution	bottle
Capture Solution	bottle
SSC Buffer	bottle
RE Buffer	bottle
BSA Solution	tube with clear cap
DNA Ligase	tube with red cap
Enrichment Control DNA	tube with orange cap
Primer 1	tube with yellow cap
Primer 2	tube with blue cap
HaloPlex Indexing Primer Cassettes	96-well plate with Indexing Primer Cassettes A01 to H12 (blue plate) <sup>*</sup>
Enzyme Strip 1	8-well strip tube with green label
Enzyme Strip 2	8-well strip tube with red label
HaloPlex or ClearSeq Probe	tube with pink cap

\*表 35のプレートマップを参照してください。

表 3	35	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
ν-	トに入	ったもの

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

## HaloPlex インデックスの塩基配列(青色プレートに入った 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 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。

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

表 36 HaloPlex の Index 配列:青色プレートで供給される Indexing Primer Cassette

旧来の Index 構成の試薬キット (Indexing Primer Cassette が透明プレートに入っている キット)に対応する試薬一覧

HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステム試薬キットは、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 が青色プレートに入っている場合は、p93 を参照してください。

表 37 HaloPlex Target Enrichment Kit 構成試薬一覧-Indexing Primer Cassette が透明プレートに 入っているキット

Design Type	HaloPlex Target Enrichment System-ILM, Box 1 <sup>*</sup>	HaloPlex Magnetic Beads Box 2	
	Store at -20°C	Store at +4°C	
Custom 1-500 kb (up to 20,000 probes), ILMFST, 96 Reactions	5190-5385 <b>OR</b> 5190-5436 <sup>†</sup>	5190-5386	
Custom 0.5-2.5 Mb OR <0.5 Mb with >20,000 probes, ILM, 96 Reactions	5190-5534 <b>OR</b> 5190-5538 <sup>†</sup>	5190-5386	
Custom 2.6 Mb-5 Mb, ILM, 96 Reactions	5190-5536 <b>OR</b> 5190-5540 <sup>†</sup>	5190-5386	
Cancer Research, ILM, 96 Reactions	5190-6236	5190-5386	
Cardiomyopathy Research, ILM, 96 Reactions	5190-6529	5190-5386	
ClearSeq AML, ILM, 96 Reactions	5190-7735	5190-5386	

\* 含まれる試薬については、表 38 を参照してください。

カスタムキット 48 反応も自動化実験にお使いいただけます。

<sup>+</sup>1-500 kb のデザインでは、初回オーダーの場合に 5190-5385 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 5190-5436 となります。

\*501 kb – 2.5 Mb のデザインでは、初回オーダーの場合に 5190-5534 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 5190-5538 となります。

\*\* 2.6 – 5 Mb のデザインでは、初回オーダーの場合に 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 5190-5540 となります。

<sup>††</sup> HaloPlex Magnetic Beads を含みます。

表 38 HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Box 1(-20°C 保存)の内訳(Indexing Primer Cassette が透明プレートに入っているキット)

Included Reagents	Format
Hybridization Solution	bottle
Ligation Solution	bottle
Wash Solution	bottle
Capture Solution	bottle
SSC Buffer	bottle
RE Buffer	bottle
BSA Solution	tube with clear cap
DNA Ligase	tube with red cap
Enrichment Control DNA	tube with orange cap
Primer 1	tube with yellow cap
Primer 2	tube with blue cap
HaloPlex Indexing Primer Cassettes	96-well plate with Indexing Primer Cassettes 1-96 (clear plate) $^{*}$
Enzyme Strip 1	8-well strip tube with green label
Enzyme Strip 2	8-well strip tube with red label
HaloPlex or ClearSeq Probe	tube with pink cap

\*表 38 のプレートマップを参照してください。

表	39	HaloPlex	Indexing	Primer	Cassette	1から	96 のプ	レートマッ	プ:96	反応キット	で透明プし	ノート
に	入った	たもの										

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

## HaloPlex インデックスの塩基配列(透明プレートに入った 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 48 反応キットには、1 から 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。

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	ACAACCA
14	AACCGAGA
15	AACGCTTA
16	AAGACGGA

#### 表 40 HaloPlex Index 1-16

## 表 41 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

## 表 42 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 43 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

## 表 44 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 45 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

## 各プロトコルで使用する消耗品

Step	Labware	1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
	Tip Boxes	1 4/12	2	2 8/12	3 4/12	4 8/12	8 8/12
01 Digestion	96 Eppendorf twin.tec full-skirt	2	2	2	2	2	2
	384 Eppendorf twin.tec	1	1	1	1	1	2
	Tip Boxes	2/12	3/12	4/12	5/12	7/12	1 1/12
00 Unbriditation	Nunc Plate	1	1	1	1	1	1
02 Hybridization	96 Eppendorf twin.tec full-skirt	1	1	1	1	1	1
	96 Eppendorf twin.tec half-skirt	1	1	1	1	1	1
- 03 Capture_v1.1 - -	Tip Boxes	11/12	1 8/12	2 5/12	3 2/12	4 8/12	9 2/12
	Waste Plate	1	1	1	1	1	1
	Nunc Plates	3	3	3	3	3	3
	96 Eppendorf twin.tec full-skirt	3	3	3	3	3	3
	96 Eppendorf twin.tec half-skirt	3	3	3	3	3	3
	Tip Boxes	6/12	1	1 6/12	2	3	6
- 04 Purification_v1.1 - -	Waste Plate	1	1	1	1	1	1
	Nunc Plate	1	1	1	1	1	1
	Reservoirs	3	3	3	3	3	3
	96 Eppendorf twin.tec full-skirt	1	1	1	1	1	1

## 各プロトコルの初期設定温度

## Temperature Presets for Bravo Deck Positions

Step	Bravo Deck Position	Temperature at Start of Protocol
01 Digestion	4	4°C
	6	4°C
	9	0°C
02 Hybridization	4	4°C
	6	4°C
	9	0°C
03 Capture_v1.1	4	54°C
	6	4°C
	9	0°C
04 Purification_v1.1	6	4°C

## 各プロトコルの所要時間

Step	Duration, 1–6 column runs <sup>*</sup>	Duration, 12 column runs*
01 Digestion	45 minutes <sup>†</sup>	90 minutes <sup>†</sup>
02 Hybridization	15 minutes	15 minutes <sup>†</sup>
03 Capture_v1.1	80 minutes <sup>†</sup>	80 minutes <sup>†</sup>
04 Purification_v1.1	30 minutes <sup>†</sup>	30 minutes <sup>†</sup>

\* Duration of steps performed by workstation; excludes time required for preparation of workstation by operator and for operator response to workstation prompts.

† Operator must be present to change tip boxes and complete other workstation prompts.

## 各プロトコル終了時のサンプルプレートの位置

## Location of DNA Samples at End of Protocol

Step	Plate Type	Bravo Deck Position
01 Digestion, 1-6 columns of samples	384 Eppendorf twin.tec (1 plate)	6
01 Digestion, 12 columns of samples	384 Eppendorf twin.tec (2 plates)	1 and 6
02 Hybridization	96 Eppendorf twin.tec, half-skirted	1
03 Capture_v1.1	96 Eppendorf twin.tec, half-skirted	6
04 Purification_v1.1	96 Eppendorf twin.tec, full-skirted	3
Copyright Agilent Technologies 2012

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

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

## ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザーの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

本プロトコル以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

HaloPlex 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。