



アジレント SureSelect XT HS2 DNA

Bravo NGS 自動化システム Option B 対応

ターゲットエンリッチメントシステム

イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンス

和文プロトコル [2022 年 12 月版 和文]

Version B2 対応

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021

本マニュアルのいかなる部分も、米国および国際著作権法に準拠する Agilent Technologies, Inc.からの事前の合意および書面による同意なしに、いかなる形式または手段（電子的保存および検索または他の言語への翻訳を含む）でも複製することはできません。

確認

Oligonucleotide sequences © 2006, 2008, and 2011 Illumina, Inc. 無断複写・転載を禁じます。イルミナシーケンサーシステムおよび関連するアッセイでのみ使用できます。

保証

本書に含まれる資料は「現状有姿」で提供され、将来の改版に際しては、予告なしに変更される可能性があります。さらに、適用法で認められる最大限の範囲で、Agilent は、本書および本書に含まれる情報に関して、明示または黙示を問わず、商品性および特定目的への適合性の黙示の保証を含むがこれらに限定されない、すべての保証を否認します。Agilent は、本書または本書に含まれる情報の提供、使用またはパフォーマンスに関連するエラーまたは偶発的もしくは間接的な損害について責任を負わないものとします。Agilent とユーザーが、本書の内容と矛盾する保証条件を別個の契約書として結んでいる場合は、別個の契約書の保証条件が優先されます。

技術ライセンス

本書に記載されているハードウェアおよび/またはソフトウェアはライセンスに基づいて提供されており、そのようなライセンスの条件に従ってのみ使用またはコピーできるとされている場合があります。

制限付き権利の説明文

米国政府の制限付き権利。連邦政府に付与されたソフトウェアおよび技術データの権利には、エンドユーザーの顧客に通常提供される権利のみが含まれます。Agilent は、FAR 12.211 (Technical Data) および 12.212 (Computer Software) に準拠して、また国防総省に対しては DFARS 252.227-7015 (Technical Data - Commercial Items) および DFARS 227.7202-3 (Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation) に準拠して、ソフトウェアおよび技術データにおける上記通常の商用ライセンスを提供します。

ご購入者への通知

本製品は、Bio-Rad Laboratories と Agilent Technologies, Inc.との間の契約に基づいて提供されており、本製品の製造、使用、販売または輸入は、Bio-Rad Laboratories 社が所有する U.S. Pat. No. 6,670,808 の対象となります。本製品の購入により、ご購入者には、ご購入頂いた量の本製品および本製品の成分を PCR (ただし、リアルタイム PCR は除く) においては研究分野 (法医学、動物実験、食品検査を含む、すべての応用研究分野を含む) で使用し、またリアルタイム PCR においては診断および予後分野で使用する譲渡不可能な権利が与えられます。本製品を、すべての応用研究分野 (法医学、動物実験、食品検査を含むがこれらに限定されない) を含む研究分野においてリアルタイム PCR に使用する権利は与えられていません。

安全上の注意

CAUTION

CAUTION 表示は危険性を示します。正しく実行または遵守されなかった場合に、製品の損傷や重要なデータの損失につながる可能性のある操作手順や方法などを示しています。CAUTION 表示の個所は、その条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

WARNING

WARNING 表示は危険性を示します。操作手順への注意を喚起するもので、この表示を無視して誤った取扱いをすると、人が死亡または重傷を負う可能性が想定される内容を示しています。WARNING 表示の個所は、条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

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、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
SureSelect XT HS2 DNA System Automated using Agilent NGS Workstation Option B
DNA Library Preparation, Pre-Capture Pooling (optional), and Target Enrichment for Illumina
Platform
Version B2, September 2022 [G9985-90010] に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント SureSelect XT HS2 Reagents を用い、イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応したライブラリを調製し、ゲノムの中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。SureSelect XT HS2 Reagent Kit と本プロトコルは、ターゲット領域をキャプチャする前に、分子バーコードが付加されたインデックスライブラリを調製する内容で、イルミナプラットフォームでの高感度次世代シーケンス(NGS)を実現しています。

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 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

この章では、Agilent SureSelect XT HS2 自動化システムの紹介、SureSelect Target Enrichment のプロトコルの概要、および SureSelect の実験をデザインする際の Agilent SureSelect XT HS2 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 AMPure XP Bead Plates の準備

この章ではワークフローを通じて必要となる AMPure XP beads を分注したビーズプレートを準備する方法について説明しています。各ステップで使用するビーズプレートは XT HS2 VWorks Form 内の異なる自動分注プロトコルを用いて作製されます。

4 サンプルの調製

この章では、ターゲット領域の濃縮に用いるライブラリの調製法について説明しています。

5 ハイブリダイゼーション

この章では、調製した DNA ライブラリに SureSelect や ClearSeq オリゴキャプチャライブラリをハイブリダイゼーションし、キャプチャする手順について説明しています。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

この章では、キャプチャ後のサンプル増幅工程とシーケンスするサンプル調製のガイドラインについて説明しています。

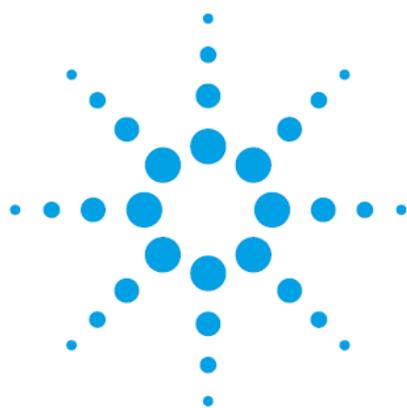
7 Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用

この章では、FFPE 由来 DNA サンプルに対する推奨するプロトコルの変更内容について説明しています。

8 リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬キットの構成成分、インデックス配列やトラブルシューティングガイドなどの参照情報を記載しています。

1 はじめに.....	6
操作に関する注意	7
安全に関する注意	8
実験に必要な試薬・装置・消耗品類.....	9
その他オプションの試薬・装置.....	14
2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment.....	15
Agilent Bravo NGS 自動化システム.....	16
SureSelect Target Enrichment Procedure の概要	28
自動化ランを行う上での実験条件の検討.....	32
3 AMPure XP Bead Plates の準備.....	35
Step 1. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備.....	36
Step 2. プレキャプチャ精製用ビーズプレートの準備	38
Step 3. プール後 DNA 濃縮用ビーズプレートの準備(プレキャプチャプール方式).....	40
Step 4. キャプチャ後精製用ビーズプレートの準備.....	42
4 サンプルの調製.....	44
Step 1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認.....	45
Step 2. DNA の断片化	47
Step 3. アダプター付加ライブラリの調製.....	56
Step 4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅.....	62
Step 5. AMPure XP beads による増幅した DNA の精製.....	68
Step 6. ライブラリ DNA のサイズチェックと定量.....	71
5 ハイブリダイゼーション.....	77
Step 1, Option 1. Single-Prex ハイブリダイゼーション用 DNA の調製	78
Step 1, Option 2. マルチプレックスハイブリダイゼーション用の DNA の調製.....	81
Step 2. DNA ライブラリとキャプチャプローブのハイブリダイゼーション	92
Step 3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャ	101
6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製.....	106
Step 1. キャプチャライブラリの増幅.....	107
Step 2. AMPure XP ビーズによる増幅したキャプチャ後ライブラリの精製.....	113
Step 3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	116
Step 4. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional).....	122
Step 5. シーケンスサンプルの調製	126
Step 6. シーケンスの開始とデータ解析.....	128
データ解析リソース	132
7 Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用.....	134
FFPE 由来 DNA サンプル用のプロトコル変更.....	135
FFPE サンプルの品質確認.....	135
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	136
8 リファレンス.....	137
キットの内容.....	138
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報.....	140
インデックスプライマーペアのプレートマップ.....	149
クイックリファレンス: マスターミックスとソースプレートの液量.....	151
クイックリファレンス: その他の試薬の容量	156
トラブルシューティングガイド	157



1 はじめに

操作に関する注意	7
安全に関する注意	8
実験に必要な試薬・装置・消耗品類	9
その他オプションの試薬・装置	14

最新のプロトコルを参照にしてください。

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

本プロトコルは Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B を用いたサンプル自動調製について説明します。Agilent の SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit (イルミナマルチプレックスシーケンシング対応) を用いて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 (G9983-90000/G9985-90000 またはその和訳版) を参照ください。

NOTE

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のでご了承ください。

NOTE

本 SureSelect XT HS2 につきましては、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。

NOTE

本プロトコルでの室温は、20~25°C の範囲となります。できるだけこの範囲内の室温で、自動化システムを操作ください。特に 20°C 未満での低温での操作はハイブリダイゼーションバッファの析出を招き、結果に悪影響を与える危険性があります。

操作に関する注意

<<重要>>

遠心の際にシールを貼ったプレートについては、特にシールを貼ったままという記載のない限り、Bravo やミニハブのデッキにプレートを載せる際に、シールを必ずはがしてください。シールをはがす時に、反動で液がはねないようにご注意ください。

- ・ このプロトコルの特定の段階では、Bravo デッキとサーマルサイクラの間で、実験者がサンプルプレート素早く移動させる必要があります。ご使用になるサーマルサイクラを Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B のごく近くに置き、迅速かつ効率的なプレートの移動ができるようにしてください。
- ・ 各自動化プロトコルのランを始める前にそのステップに詳述されているように Agilent Bravo NGS 自動化システムを準備してください。ワークステーションの Labware MiniHub にプレートをセットするには、いつも 50 ページの図 4 の向き(A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる)でプレートを置いてください。
- ・ 赤いアルミニウムインサートにプレートをセットする場合やシルバーの Nunc Deep Well プレートインサートに Agilent Deep Well プレートをセットする場合に、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。
- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物のコンタミネーションを防ぐため、以下を実施することをお勧めします。
 1. PCR 前のサンプルを扱う場所と PCR 後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用してください。特に、PCR 後のエリアで使用するものを PCR 前の過程で使用するのは避けてください。
 2. 実験スペースは常にクリーンな状態にしてください。PCR 前の過程では作業台を 10% bleach solution やその相当品により、日常的に清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ プロトコル中に示されている stopping point でサンプルを-20°C で保存する場合は、サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。
- ・ Biosafety Level 1(BSL1)のルールに基づき、実験を行います。

安全に関する注意

CAUTION

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

実験に必要な試薬・装置・消耗品類

SureSelect XT HS2 自動化プロトコルは、以下の項目によって必要な消耗品・器具が異なります。

- ・ **DNA サンプルタイプ**: fresh または fresh-frozen サンプル由来の質の高い gDNA あるいは FFPE 由来 gDNA
- ・ **DNA 断片化の方法**: 機械(コバリス)による断片化、あるいは酵素による断片化
- ・ **マルチプレックスシーケンスのためのライブラリのプール方式**:
プレキャプチャプール方式あるいはポストキャプチャプール方式

以下の表を参照し、必要な消耗品・器具を確認してください。

- ・ すべてのサンプルタイプとワークフローで必要な試薬・装置・消耗品については表 1 と表 2 を参照してください。
- ・ SureSelect XT HS2 DNA 試薬キットについては表 3 を参照してください。プレキャプチャプール方式とポストキャプチャプール方式それぞれに適したキットがあります。
- ・ キャプチャライブラリについては表 4 を参照してください。プレキャプチャプール方式とポストキャプチャプール方式それぞれに適したプローブがあります。
- ・ DNA サンプルタイプや断片化方法によって必要となる機器および消耗品については表 5 を参照してください。
- ・ その他オプションで必要となる試薬・装置については表 6 を参照してください。

表 1 必要な試薬 すべてのサンプルタイプ・ワークフロー共通

必要な試薬(すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
AMPure® XP Kit (SPRI beads) ※	Beckman Coulter Genomics	A63880	指定	5 mL	大容量タイプ(60mL [A63881], 450mL [A63882])もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 ※	Thermo Fisher Scientific	65601	指定	2 mL	大容量タイプ(10mL [65602], 50mL [65604D]) もあります。
1xLow TE Buffer	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	10mM Tris-HCl, pH7.5 ~ 8.0, 0.1mM EDTA
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850	指定	100 assay	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。 大容量タイプ(500 assays [Q32853])もあります。
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと

※SureSelect DNA AMPure® XP BeadsおよびSureSelect Streptavidin Beadsを含んでいるSureSelect XT HS2 DNA Reagent kit (G9982A, G9984A, G9984B, G9984CあるいはG9984D)をご利用の場合は、別途購入する必要はありません。

1 はじめに

表 2 必要な器具・消耗品 すべてのサンプルタイプ・ワークフロー共通

必要な機器、消耗品類(すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent NGS Work Station Option B	Agilent	G5522A / G5574AA	指定		
Robotic Pipetting Tips (Sterile, Filtered, 250 µL)	Agilent	19477-022	指定		1 ケース96 チップ入り, 50 ケース
サーマルサイクラー (96ウェル, 0.2 mlブロック)			相当		HotTop使用 下記のいずれかのプレートに合うサーマルサイクラーを選択して下さい。
PCR plate			指定		以下のプレートに対応しています。 ・ 96 ABI PCR half-skirted plates (MicroAmp Optical plates), Thermo Fisher Scientific p/n N8010560 ・ 96 Agilent semi-skirted PCR plate, Agilent p/n 401334 ・ 96 Eppendorf twin.tec half-skirted PCR plates, Eppendorf p/n 951020303 ・ 96 Eppendorf twin.tec PCR plates (full-skirted), Eppendorf p/n 951020401
Eppendorf twin.tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	95102000401	指定		951020619でも可
Agilent Reservoirs, Single cavity, 96 pyramids base geometry, 19 mm height	Agilent	201254-100	指定		
Agilent Reservoirs, Single cavity, 96 pyramids base geometry, 44 mm height	Agilent	201244-100	指定		
Agilent Storage/Reaction Microplates, 96 wells, 1 mL/round well	Agilent	203426-100	指定		Thermo Fisher Scientific Nunc DeepWell Plates (p/n 260251)でも可
Agilent Storage/Reaction Microplates, 96 wells, 2 mL/square well	Agilent	201240-100	指定		Axygen p/n P-2ML-SQ-C, E & K Scientific p/n EK-2440 でも可
Nucleic acid surface decontamination wipes	Thermo Scientific	7008	相当		自動化システムの清掃に使用します
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q33228	指定		スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit assay tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856	指定		QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用して下さい。
遠心分離機	Eppendorf	5804	相当		96 Well Plate 対応タイプ、Deep Well (高さ 31.35 mm) が入ること、1000 g 以上
96ウェルプレートもしくは 8 strip tubes 遠心機	KUBOTA または ワケンビーテック		相当		96ウェルプレートもしくは8 strip tubesのスピンドダウン用 ・96ウェルプレート用: PlateSpin II (KUBOTA) ・8 strip tubes用: 卓上遠心機 プチチェンジ (ワケンビーテック)
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12331D	相当		Dyna-Mag-96 (12331D) は96 well plate・8連チューブ兼用。 マグナススタンド [日本ジェネティクス](p/n FG-SSMAG2)も使用可 (8連チューブ用)。 注意: ウェルの一方に磁気ビーズが集まるタイプを必ず選んでください。リング状に磁気ビーズが集まるタイプは使用不可。
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体で同時に行うときに便利です。
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					
ボルテックスミキサ					
アイスバケツ					
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		

ライブラリQC用(お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用、バイオアナライザ用あるいはFragment Analyzer用いずれかの消耗品をご用意下さい。)					
DNA解析用の電気泳動装置(いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。)					
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991AA / G2992AA	指定		DNAの定性または定量に使用することができません。 Agilent 2200 TapeStation, Agilent 4150 TapeStation [p/n G2992AA] の使用も可能です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		DNAの定性または定量に使用することができません。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer		M5310AA / M5311AA / M5312AA			
Agilent 4200/ 4150 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	112サンプル分	
96-well sample plate	Agilent	5042-8502	指定		
96-well plate foil seals	Agilent	5067-5154	指定		
8-well tube strips	Agilent	401428	指定		
8-well tube strip caps	Agilent	401425	指定		
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品					
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	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。Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer消耗品					
NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	Agilent	DNF-473-0500	指定		
HS NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	Agilent	DNF-474-0500	指定		

1 はじめに

表 3 SureSelect XT HS2 DNA 試薬キット

SureSelect XT HS2試薬キット					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
プレキャプチャブル方式					
SureSelect XT HS2 DNA library preparation kit for ILM (Pre PCR), 96反応分* (いずれか1つ)	Agilent	G9985A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9985B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9985C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9985D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
AND					
SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment Kit (Post PCR), 12 Hybst	Agilent	G9987A	指定	12ハイブリダイゼーション (計96サンプル分)	マルチプレックス対応
ポストキャプチャブル方式					
SureSelect XT HS2 DNA Reagent kit (96反応分) †	Agilent	G9983A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9983B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9983C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9983D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
OR					
SureSelect XT HS2 DNA Reagent kit with AMPure XP / Streptavidin Beads (96反応分) †	Agilent	G9984A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9984B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9984C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9984D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)

†96反応のキットには1ランあたりに24サンプルを含めた場合の4ラン分に相当する量が含まれます。Enzymatic Fragmentation Kitは含まれません。

表 4 キャプチャライブラリ

SureSelect キャプチャライブラリ (ブローブ)			
品名	製造メーカー	品番	備考
カスタムブローブ* プレキャプチャプール用			
SureSelect Custom Tier1 1-499 kb (6 [†] or 30 [‡] Hybs)	Agilent		SureSelectカスタムブローブはカスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。
SureSelect Custom Tier2 0.5 -2.9 Mb (6 [†] or 30 [‡] Hybs)	Agilent		
SureSelect Custom Tier3 3 -5.9 Mb (6 [†] or 30 [‡] Hybs)	Agilent		
SureSelect Custom Tier4 6 -11.9 Mb (6 [†] or 30 [‡] Hybs)	Agilent		
SureSelect Custom Tier5 12-24 Mb (6 [†] or 30 [‡] Hybs)	Agilent		
カスタムブローブ* ポストキャプチャプール用			
SureSelect カスタム Tier1 1 - 499 kb	Agilent		SureSelectカスタムブローブはカスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。
SureSelect カスタム Tier2 0.5 - 2.9 Mb	Agilent		
SureSelect カスタム Tier3 3.0 - 5.9 Mb	Agilent		
SureSelect カスタム Tier4 6.0 - 11.9 Mb	Agilent		
SureSelect カスタム Tier5 12.0 - 24.0 Mb	Agilent		
設計済みキャプチャライブラリ プレキャプチャプール用			
SureSelect HS PreCap Human All Exon V8 (12 Hybs)**	Agilent	5191-6878	Design ID: S33266340
SureSelect HS PreCap Human All Exon V8+UTR (12 Hybs)**	Agilent	5191-7406	Design ID: S33613271
SureSelect HS PreCap Human All Exon V8+NCV (12 Hybs)**	Agilent	5191-7412	Design ID: S33699751
SureSelect HS PreCap Human All Exon V7 (12 Hybs)**	Agilent	5191-5735	Design ID: S31285117
SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 (12 Hybs)**	Agilent	5190-9501	Design ID: S30409818
SureSelect XT2 Mouse All Exon Genome (12 Hybs)**	Agilent	5190-4682	Design ID: S0276129
ClearSeq Comprehensive Cancer XT2 (6 Hybs)**	Agilent	5190-8018	Design ID: 0425761
ClearSeq Inherited Disease XT2 (12 Hybs) [†]	Agilent	5190-7525	Design ID: S0684402
設計済みキャプチャライブラリ ポストキャプチャプール用			
SureSelect XT HS Human All Exon V8	Agilent	5191-6875	96 反応、Design ID: S33266340
SureSelect XT HS Human All Exon V8+UTR	Agilent	5191-7403	96 反応、Design ID: S33613271
SureSelect XT HS Human All Exon V8+NCV	Agilent	5191-7409	96 反応、Design ID: S33699751
Ssel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7	Agilent	5191-4029	96 反応、Design ID: S31285117
SureSelect XT Clinical Research Exome V2	Agilent	5190-9492	96 反応、Design ID: S30409818
SureSelect XT Mouse All Exon	Agilent	5190-4642	96 反応、Design ID: S0276129
ClearSeq Comprehensive Cancer XT	Agilent	5190-8012	96 反応、Design ID: 0425761
ClearSeq Inherited Disease XT	Agilent	5190-7519	96 反応、Design ID: S0684402
設計済みキャプチャライブラリに追加する場合 プレキャプチャプール用			
SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 Plus1 (12 Hybs)**	Agilent		カスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus2 (12 Hybs)**	Agilent		
ClearSeq Comprehensive Cancer Plus XT2 (6 Hybs) [†]	Agilent		
ClearSeq Inherited Disease Plus XT2 (12 Hybs)**	Agilent		
設計済みキャプチャライブラリに追加する場合 ポストキャプチャプール用			
Ssel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7 Plus1	Agilent		カスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。
Ssel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7 Plus2	Agilent		
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus1	Agilent		
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus2	Agilent		
ClearSeq Comprehensive Cancer Plus XT	Agilent		
ClearSeq Inherited Disease Plus XT	Agilent		

*2020年8月以降に設計されたカスタムブローブは、最新の製造プロセスで製造されています。デザインサイズのTierは製品ラベルに記載されています。2020年8月以前に設計・注文されたカスタムブローブは、従来の製造プロセスを使用して製造されており再注文が可能です。従来の製造プロセスの製品ラベルには、デザインサイズのTierは記載されていません。両方のカテゴリーのカスタムブローブは、プロトコルに記載されている同一の最適化されたターゲット濃縮プロトコルを使用します。

[†]6ハイブリ分のキャプチャブローブは、推奨構成の16サンプル/プールでプールされた計96サンプル分に対応しています(6ハイブリ x 16サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の6ハイブリダイゼーションに十分な試薬が含まれています。

[‡]30ハイブリ分のキャプチャブローブは、推奨構成の16サンプル/プールでプールされた計480サンプル分に対応しています(30ハイブリ x 16サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の1ランあたり30ハイブリダイゼーションに十分な試薬が含まれています。

**12ハイブリ分のキャプチャブローブは、推奨構成の8サンプル/プールでプールされた計96サンプル分に対応しています(12ハイブリ x 8サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の1ランあたり6ハイブリダイゼーション反応を2ランするために十分な試薬が含まれています。

1 はじめに

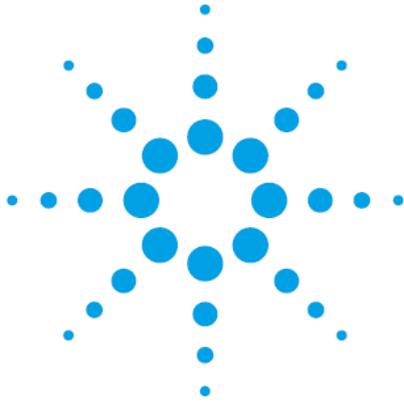
表 5 サンプルタイプや断片化方法によって必要となる機器および消耗品

サンプルタイプや断片化方法により必要な機器および消耗品					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
高品質なDNA (FFPE由来DNAサンプルには必要ありません)					
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304 (50サンプル) 51306 (250サンプル)	相当		高品質なgDNAを精製するシステム例
FFPE由来DNA(高品質なDNAサンプルには必要ありません)					
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 samples	Qiagen	56404 (50サンプル)	指定		FFPEからDNAを精製するシステム
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)	指定	16反応分 または 96反応分	FFPE由来DNAサンプルの場合、 ゲノムDNA QCIに使用します。
Genomic DNA Screen Tape	Agilent	5067-5365	指定	7枚	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
gDNAを機械で断片化する場合(酵素による切断には使用しません)					
Covaris Sample Preparation System	Covaris (エムエス機器)	Model E220	指定		gDNAをロスなく再現性よく、かつ確実に150-200 bpの長さに断片化するために、Covarisの使用が指定されています。E220以外のモデルをご使用の場合は製造元にお問い合わせください。ネプライザの使用は推奨しません。
Covaris microTUBE sample holders	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		
gDNAを酵素反応で断片化する場合(機械による切断には使用しません)					
SureSelect Enzymatic Fragmentation System	Agilent	5191-4079 (16反応) 5191-4080 (96反応)	指定		SureSelect XT HS2 DNA Starter kitには含まれています。

その他オプションの試薬・装置

表 6 その他オプションの試薬・装置

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Tween 20	Sigma Aldrich	P9416-50ML	相当	50 mL	シーケンスライブラリの保存のために使用します。
AriaMx リアルタイム定量PCRシステム	Agilent	G8830A	相当		FFPE由来DNAサンプルの場合、ゲノムDNA QCに使用します。
AriaMx 96-well plates またはoptical Tube Strip	Agilent	401490 または 401493	相当		AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。
Mx3000p/Mx3005P Optical Strip caps	Agilent	401425	相当		AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。



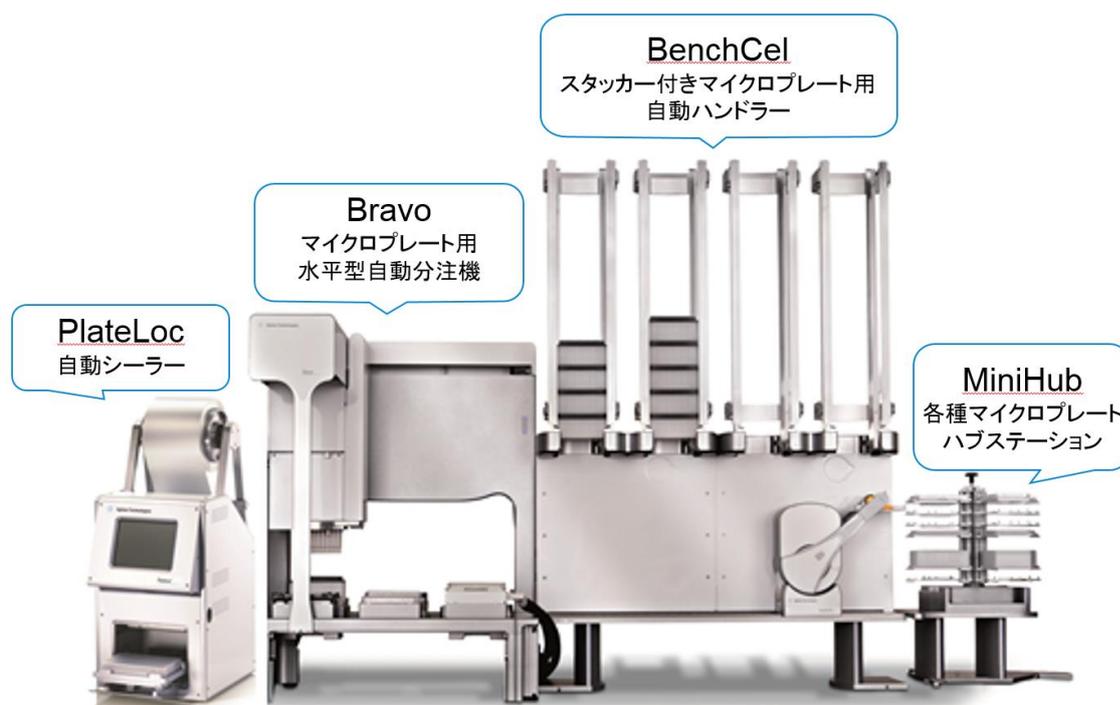
2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

Agilent Bravo NGS 自動化システム	16
Bravo プラットフォームについて	17
SureSelect Target Enrichment Procedure の概要	28
自動化ランを行う上での実験条件の検討	32

この章では、Agilent Bravo NGS 自動化システムの紹介、SureSelect XT HS2 Target Enrichment のプロトコル概要、および Agilent Bravo NGS 自動化システムを使った SureSelect 実験の計画を立てる際に考慮すべきことについて説明しています。

Agilent Bravo NGS 自動化システム

Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B は、多目的自動分注機の Bravo プラットフォーム、スタッカー付きマイクロプレート用自動ハンドラーの BenchCel、各種マイクロプレートハブステーションである MiniHub、自動シーラーの PlateLoc から構成されています。Bravo プラットフォームのデッキのオプションである Inheco ヒートブロック(4 番、6 番)とチラー(9 番)が Bravo に接続されています。さらに PlateLoc と BenchCel の動作に使用するエアコンプレッサー(または圧縮空気のライン)がシステムに接続されています。



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。表 7 のユーザーガイドのリストを参照してください。

Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B の各コンポーネントの一般的な機能と操作については表 7 のユーザーガイドを確認してください。SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントワークフローに使用する手順については、このユーザーガイドで説明しています。

表 7 Agilent Bravo NGS 自動化システムユーザーガイド

Device	User Guide part number
Bravo Platform	SD-V1000376 (formerly G5562-90000)
VWorks Software	G5415-90068
BenchCel Microplate Handler	G5580-90000
Labware MiniHub	G5584-90001
PlateLoc Thermal Microplate Sealer	G5585-90010

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 ウェルおよび 1536 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、0.3 μL から 250 μL までの液体を正確に分注できます。本プロトコルで使用しているピペットヘッドでは、2 μL から 175 μL までの液体を正確に分注できます。

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。

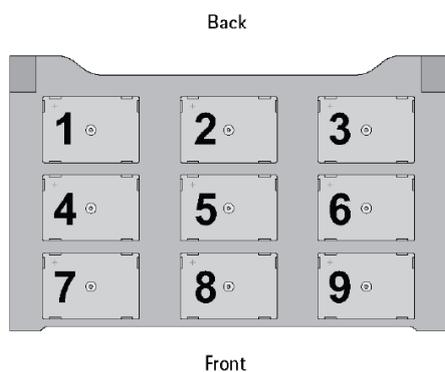


図 1 Bravo プラットフォームデッキ

BenchCel について

BenchCel のハンドラーが動作するスペースに、指定された以外のものを絶対に置かないように、また動作の邪魔になるものがないように、注意してください。BenchCel のスタッカーに戻されたチップボックスは、使用済みのものなので、ラン終了後、チップボックスを取り除き、中のチップを廃棄するようにしてください。

BenchCel の電源をオフすると、BenchCel のハンドラーは下方のホームポジションまで下がって止まります。指を挟まないように注意してください。

万一操作ミスなどで、BenchCel のハンドラーのアーム部分が曲がってしまった時には、専任のエンジニアによる位置調整が必要です。それ以上触らずに、本プロトコルの末尾に記載されているサポートお問い合わせ窓口にご連絡ください。

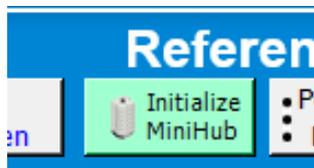
MiniHub について

MiniHub にプレートセットする際には、いつも 50 ページの図 4 の向き (A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる) でプレートを置いてください。

MiniHub は最初に電源を入れた時には自由に動かすことができますが、一度初期化された後は、手で向きを変えることができません。無理に動かさないように注意してください。

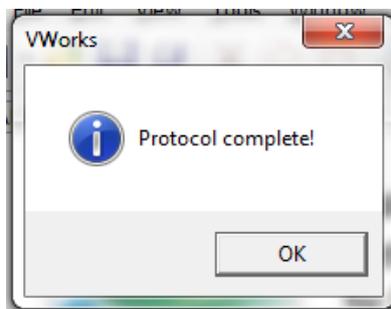
[MiniHub のイニシャライズボタン追加]

MiniHub の横や後ろにスペースがなく、MiniHub にプレートをセットしにくい場合、MiniHub の電源をいったん OFF にして、手動で MiniHub を回転させて必要なプレートをセットし、セットが終わった後に MiniHub の電源を再び ON にして、Initialize MiniHub ボタンを押してイニシャライズをかけることができます。



ただし、この機能は、上記の Initialize MiniHub のボタンがついた Form でのみ使用可能です。このボタンがついていない Form を使用している場合、MiniHub の電源を切って MiniHub を手で回転させないようにしてください。MiniHub の電源を OFF にして位置を変えた場合、必ず、MiniHub のイニシャライズ操作が必要です。イニシャライズを行わずに動作を進めると、エラーが発生します。

本ボタンをクリックして、MiniHub のイニシャライズを行うと、終了時に下記の画面が現れます。



OK ボタンを押してから、次の操作を行ってください。

MiniHub の棚の位置は高い精度でセットされています。もし万一無理な力を加えて、棚の位置が変わってしまった場合、専任のエンジニアによる位置調整が必要です。それ以上触らずに、本プロトコルの末尾に記載されているサポートお問い合わせ窓口にご連絡ください。

PlateLoc について

電源を入れて温度と空気圧が設定値に達するまではエラーの画面が出ます。温度と空気圧が設定値に達すると、画面の右側に RUN のボタンが出て、動作できるようになります。PlateLoc 用のシールは数種類ありますが、SureSelect XT HS2 自動化システムでは、Clear Peelable Seal を使用しています。この Clear Peelable Seal でシールしたプレートは、数時間から1日までは 0~80°Cの低温で保存できますが、それ以上の期間の保存には適していません。1日より長く保存する場合、シールではなく、適切な Strip キャップなどをはめて密閉した状態で保管ください。

電源オン

エアコンプレッサー、Bravo, BenchCel, MiniHub, 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、BenchCel の電源は本体右背面に、MiniHub の電源は MiniHub が接続されている電源ボックスの正面にあります。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, BenchCel, MiniHub, PlateLoc, Inheco ヒートブロック、チラーの電源を落としていきます。BenchCel の電源を落とす時には、ハンドラーの下部に指を挟まないように注意してください。

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。

2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

Bravo デッキヒートブロックの温度設定

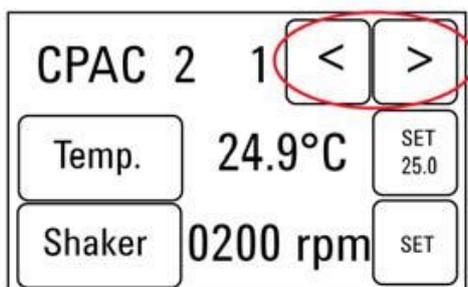
Bravo デッキ 4 番と 6 番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプルプレートをインキュベートするために使用しています。高温 (85°C) または低温 (4°C) でのインキュベーションステップを含むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておく、操作時間を短縮できます。

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 8 のように示されます。

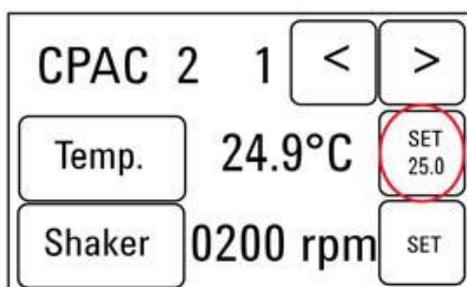
表 8 Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示

Bravo Deck Position	Designation on Inheco Multi TEC Control Screen
4	CPAC 2 1
6	CPAC 2 2

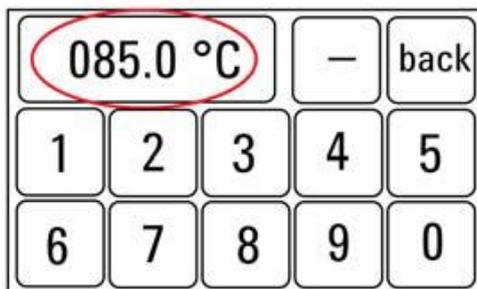
1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置 (CPAC 2 1 または CPAC 2 2) を選択します。



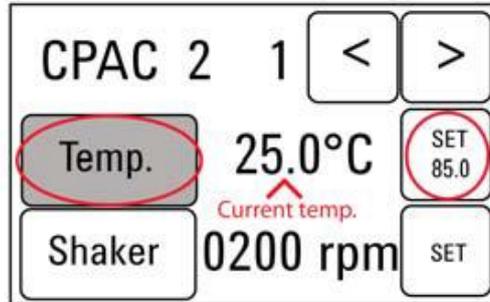
2. 選択したデッキ位置のヒートブロックの温度を設定するには、SET ボタンを押します。



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し、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。)



- 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ため、ご注意ください。



チラーの温度設定

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

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



VWorks Automation Control ソフトウェア

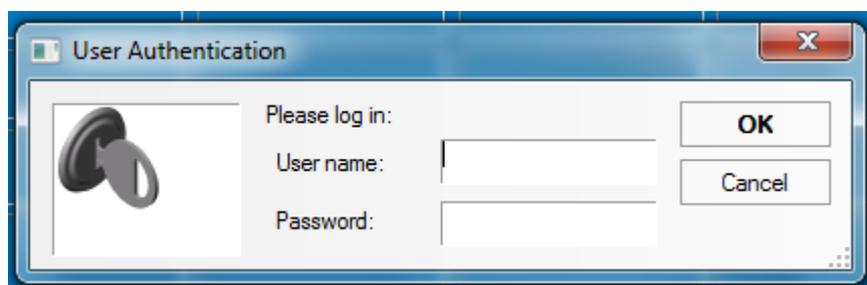
VWorks ソフトウェアはお使いの Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B に含まれ、ロボットと周辺機器をパソコンで制御できます。Agilent Bravo NGS 自動化システムには、SureSelect システムに必要な自動分注プロトコルがすべて入った VWorks ソフトウェアがあらかじめインストールされています。VWorks ソフトウェアを使い始める際の一般的な取扱い方と含まれるプロトコルについて、以下に説明します。SureSelect の各ステップの操作で指定された VWorks プロトコルを使用する際に、その VWorks プロトコルが必要となる設定については、プロトコルの各ステップで説明します。

NOTE

このマニュアルは、VWorks software version 13.1.0.1366 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 VWorks アイコン、または XT HS2 VWorks Form 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。)



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。
3. Create New User を選択します。この画面で、適切な User Name と Password を設定してください。また適切な Security Level を設定ください。Administrator レベルおよび Technician レベルは、メソッドの書き換えが可能なので、Administrator 権限者以外の使用はお勧めしません。**通常はメソッドの書き換えができない Operator レベルでの設定を推奨します。**ただし、アクセスできる機能は制限されます。
4. Password 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。

VWorks プロトコルとランセットファイル

VWorks ソフトウェアの自動化プログラム実行用のファイルには、.pro(プロトコル)ファイルと.rst(ランセット)ファイルの 2 種類があります。ランセットファイルはワークステーションで複数の自動化プロトコルを組み合わせて一度に実行するために使用します。

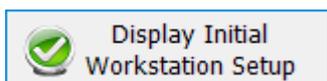
SureSelect XT HS2 DNA を使用したランの設定と開始

SureSelect XT HS2 VWorks Form を起動すると以下のようなフォームが表示されます。

1. デスクトップの XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x.VWForm ショートカットを使ってこのフォームを開きます (x.x.x はバージョン番号を示します)。



2. フォームのドロップダウンメニューから、適切な SureSelect 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. このフォームですべてのランのパラメータを決定したら、Display Initial Workstation Setup をクリックします。



2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

4. フォーム上の Workstation Setup の部分には、Bravo、BenchCel、MiniHub のそれぞれについて、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場所が示されます。この指定場所を間違えると、自動化プロトコルは正常にランされませんので、必ずダブルチェックするようにしてください。

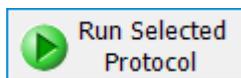
The screenshot displays the Agilent NGS workstation software interface. On the left, the 'Protocol Parameters' section includes steps for selecting a protocol, labware, and columns, along with controls for running and pausing the protocol. The central part of the interface features a 3D model of a DNA double helix and the text: 'SureSelect^{XT} HS2 DNA with Enzymatic Fragmentation and Dual Indexing for illumina sequencers'. On the right, the 'NGS Workstation B Setup' section shows a 'Bravo Deck' layout with 9 positions (1-9) and a 'BenchCel 4R' layout with 4 stackers (1-4) and 5 shelves (1-5). The Bravo Deck layout is as follows:

Bravo Deck		
1 Waste Plate (Agilent 2ml, Square Well)	2	3
4 Pipettor Red Insert	7 Shaker	8 Pipettor Empty Eppendorf Twin.tec Plate
7 Magnet Sheared DNA in Eppendorf Twin.tec Plate	8	9 Chiller Master Mixes in Agilent DWI Plate (Col 1-3)

The BenchCel 4R layout is as follows:

BenchCel 4R				
Stacker 1	Stacker 2	Stacker 3	Stacker 4	
7 Tip Boxes	Empty	Empty	Empty	
MiniHub	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5	Aliquotted AMPure XP beads in Agilent DeepWell Plate			
Shelf 4	Empty Eppendorf Twin.tec Plate			
Shelf 3	Empty Eppendorf Twin.tec Plate	Empty Eppendorf Twin.tec Plate		
Shelf 2	New Tip Box (or from EruzFrag protocol)	Nuclease-free Water in Agilent Shallow Well Reservoir		
Shelf 1	Empty Tip Box (or from EruzFrag protocol)	70% Ethanol in Agilent Deep Well Reservoir		Empty Tip Box

5. 自動化システムに正しくセットアップされたことを確認したら、Run Selected Protocol をクリックします。

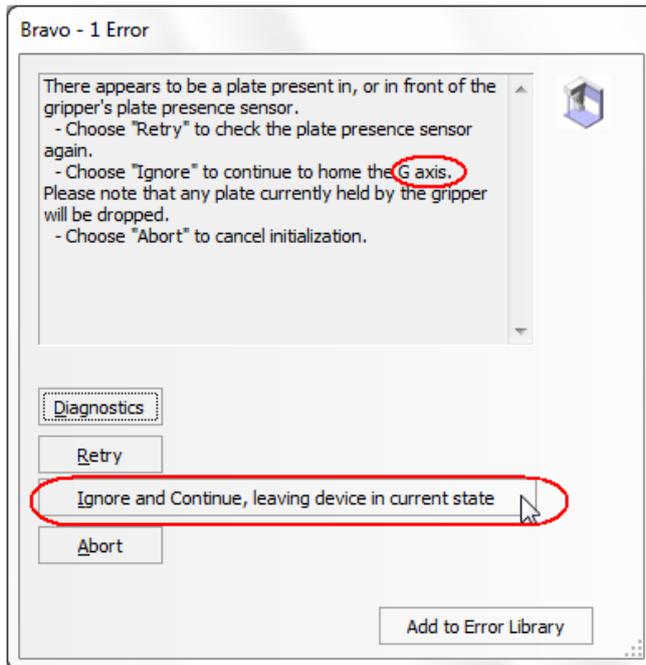


Bravo の初期化

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、操作してください。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でエラーで止まってしまいます。正しい選択を行うようにご注意ください。

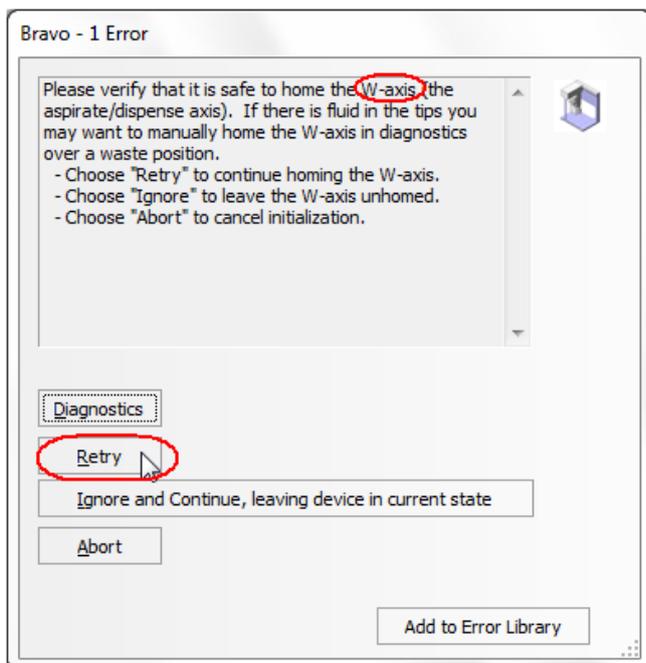
1. 最初はグリッパーの初期化に伴う G axis のエラー表示が出ます。

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。



2. 次に W-axis の初期化に伴うエラー表示が出ます。

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、その間はスクリーンで入力したコマンドは Bravo NGS 自動化システムでは実行されません。ランを開始してもワークステーション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。

1. 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。)



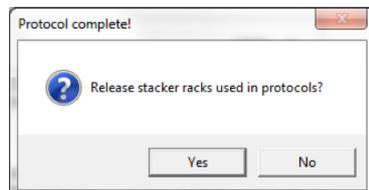
2. そのインジケータに Simulation is on と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押してシミュレーションモードをオフにしてください。

NOTE

XT_HS2_ILM 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。

プロトコルまたはランセットの終了

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 BenchCel ラックを解放し、次の.pro または.rst 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。



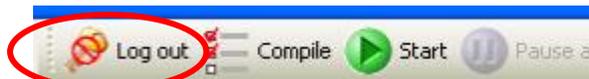
VWorks の終了

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 してください。

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



2. 画面上部の Control Tool 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恐れがあります。ログイン後は操作をせずに、ただちに Close してください。

SureSelect Target Enrichment Procedure の概要

イルミナ社のペアエンドシーケンスプラットフォームを用いてライブラリを調製する際の SureSelect XT HS2 DNA ターゲットエンリッチメントのワークフローを図 2 に示します。

SureSelect XT HS2 DNA ライブラリ調製キットでは 4 枚の異なるインデックスペアプレートを使用できます (149 ページのインデックスプライマーペアのプレートマップを参照)。使用する SureSelect XT HS2 試薬キットに応じて、マルチプレックスシーケンスのために、ハイブリダイゼーションキャプチャ前にサンプルをプールするか (プレキャプチャプール方式)、ハイブリダイゼーションキャプチャ後にサンプルをプールするか (ポストキャプチャプール方式) を選択できます。

表 10 には、SureSelect 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、ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション後の増幅の各章を参照してください。

SureSelect XT HS2 ライブラリ調製プロトコルは 10~200 ng の DNA インプット量範囲で、Fresh なサンプル由来の高品質 gDNA から FFPE サンプル由来の gDNA まで対応しています。

SureSelect XT HS2 DNA NGS Target Enrichment Workflow with Option for Pre-Capture Pooling

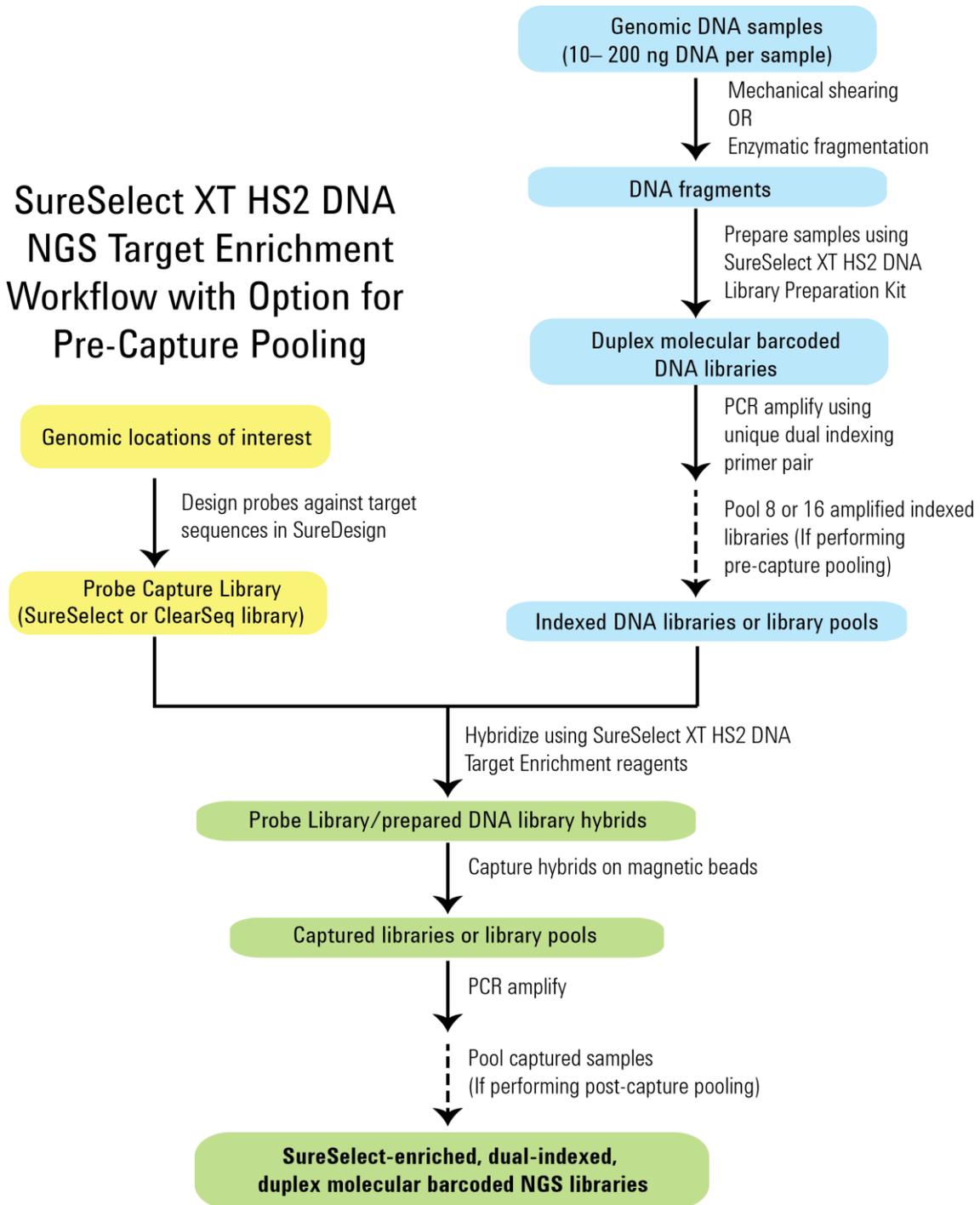


図 2 ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー

ワークフローの調整

SureSelect XT HS2 DNA ターゲットエンリッチメントワークフローでは表 9 の条件に従ってワークフローを決定します。

DNA サンプルの品質 fresh または fresh-frozen のサンプルからの高品質 DNA から、FFPE 由来の DNA まで、プロトコルのわずかな変更で対応できます。

DNA の断片化方法 酵素による断片化の自動化プロトコルが使用できます。(方法 1: 自動化システムを用いた酵素による断片化)を参照このステップの代わりに、マニュアルでの機械的断片化(方法 2. コバリスを用いた DNA 断片化)を行うことが可能です。

サンプルのプール方式 SureSelect XT HS2 自動化ワークフローは 2 タイプのサンプルのプールを行えます。それぞれで使用する SureSelect XT HS2 DNA 試薬が異なります。

- ・プレキャプチャプール方式 - インデックス付加の PCR 反応後に 8 あるいは 16 サンプルのライブラリをプールします。その後それぞれのライブラリプールに対しプローブへのハイブリダイゼーション反応を行います。
- ・ポストキャプチャプール方式 - ハイブリダイゼーション反応を行い、キャプチャライブラリを PCR 増幅した後、シーケンス解析を行う前にサンプルをプールします。プールするライブラリの数は、シーケンスプラットフォームのアウトプットや、目的のシーケンスデータ量に依存します。

表 9 自動化プロトコルで対応しているワークフローの変更点

Property	Options	Usage Notes
DNA Sample Integrity	Intact DNA	Use standard protocol with 10-200 ng input DNA
	FFPE DNA	Qualify DNA before use in assay; see "Protocol modifications for FFPE Samples" on page 136 for summary of protocol modifications.
DNA Fragmentation Method	Enzymatic Fragmentation	Use the Enzymatic Fragmentation automation protocols to perform enzymatic fragmentation of DNA samples. The protocol EnzFrag_XT_HS2_ILM executes the liquid handling steps for the enzymatic fragmentation reactions. The protocol EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM directs the dilution of the fragmented samples to the concentration needed for library preparation. Requires purchase of SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit, 96 Reactions Automation (Agilent p/n 5191-6764)
	Mechanical (Covaris) Shearing	Perform mechanical shearing on Covaris Sample Preparation System using manual liquid handling (no automated protocol). Requires purchase of Covaris Sample Preparation System and consumables (see "Additional Required Materials based on DNA Sample Type/Fragmentation Method" on page 16).
Pooling Strategy	Pre-Capture Pooling	For library preparation, use a SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kit that is compatible with pre-capture pooling (e.g., Agilent part numbers G9985A through G9985D). For target enrichment, use the SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment Kit (Post PCR). Refer to Table 3 on page 14.
	Post-Capture Pooling	Use one of the SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits compatible with post-capture pooling (Agilent part numbers G9983A through G9983D, or G9984A through G9984D). Kits include reagents for both library preparation and target enrichment. Refer to Table 3 on page 14.

ワークフローで使用される自動化プロトコル

表 10 ワークフローで使用される VWorks プロトコルおよびランセットの概要

Workflow Step	Substep	VWorks Protocols Used for Agilent NGS Workstation automation
AMPure XP Bead Aliquoting	Aliquot AMPure XP beads for use in the Library Prep runset	AMPureXP_Aliquot (Case Library Prep)
	Aliquot AMPure XP beads for use in the Pre-Capture PCR purification protocol	AMPureXP_Aliquot (Case Pre-Capture PCR)
	Aliquot AMPure XP Beads for use in the Pre-Capture Pooling protocol for concentrating the DNA	AMPureXP_Aliquot (Case Concentration of Pool)
	Aliquot AMPure XP Beads for use in the Post-Capture PCR purification protocol	AMPureXP_Aliquot (Case Post-Capture PCR)
Enzymatic DNA Fragmentation*	Shear DNA samples using enzymatic fragmentation	EnzFrag_XT_HS2_ILM
	Dilute fragmented samples to appropriate concentration	EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM
Library Preparation	Prepare duplex, molecular-barcoded DNA libraries	Runset LibraryPrep_XT_HS2_ILM
	Amplify indexed DNA libraries with unique dual indexing primer pair	Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM
	Purify indexed DNA libraries using AMPure XP beads using an elution volume suitable for single-plexed hybridization (i.e., the post-capture pooling workflow)	AMPureXP_XT_HS2_ILM (Case Pre-Capture PCR – SinglePlex)
	Purify indexed DNA libraries using AMPure XP beads using an elution volume suitable for multi-plexed hybridization (i.e., the pre-capture pooling workflow)	AMPureXP_XT_HS2_ILM (Case Pre-Capture PCR – MultiPlex)
	Analyze indexed DNA libraries using Agilent TapeStation platform	TS_D1000
Library Pooling (for pre-capture pooling workflow)	Pool indexed DNA libraries in pools of 8 or 16	PreCapture_Pooling <i>This protocol is set up and executed from the XT HS2 Pooling VWorks Form</i>
Multi-Plex Pre-Hybridization (for pre-capture pooling workflow)	Dilute pooled samples of indexed DNA libraries to normalize volumes to 100 µL	Aliquot_Water
	Concentrate pooled samples to 24 µL for hybridization	AMPureXP_XT_HS2_ILM (Case Concentration of Pool)
Single-Plex Pre-Hybridization (for post-capture pooling workflow)	Aliquot 500-1000 ng of prepped libraries	Aliquot_Libraries
Hybridization and Capture	Hybridize prepped libraries or library pools (target enrichment)	Hyb_XT_HS2_ILM
	Capture and wash DNA hybrids	Runset SSELCCapture&Wash_XT_HS2
Post-Capture Sample Processing	Amplify target-enriched libraries or library pools	Post-CapPCR_XT_HS2_ILM
	Purify enriched, amplified libraries or library pools using AMPure XP beads	AMPureXP_XT_HS2_ILM (Case Post-Capture PCR)
	Analyze final libraries or library pools using Agilent TapeStation platform	TS_HighSensitivity_D1000
	For post-capture pooling workflow, pool indexed DNA libraries	Aliquot_Captures

* To shear DNA samples mechanically, rather than enzymatically, perform liquid handling steps manually on the Covaris Sample Preparation System (see "Method 2. Prepare fragmented DNA by mechanical shearing" on page 55). The XT HS2 VWorks Form does not include an automation protocol for mechanical shearing.

自動化ランを行う上での実験条件の検討

Agilent SureSelect XT HS2 自動化システムを用いて、Illumina プラットフォームでシーケンスするために処理できる 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。

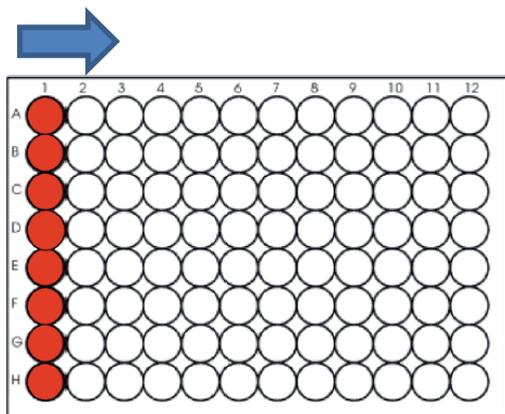
表 11 カラム数とサンプル数の対応表

Number of Columns Processed	Total Number of Samples Processed
1	8
2	16
3	24
4	32
6	48
12	96

購入した試薬で一度のランで処理できる列数およびサンプル数は、実験の計画に依存します。(表 1 を参照)。各 96 反応分のキットは、1 ランあたり 3 カラム (24 検体分) の実験を 4 回行うために必要な試薬量を含んでいます。24 より少ない検体数でランしたときには、試薬が 96 検体分には足りなくなります。できるだけ 24 検体単位で処理するように、実験計画を立ててください。

自動化プロセスで96ウェルプレートに入れるgDNAサンプルの位置

- Agilent SureSelect XT HS2 自動化システムは、サンプルの処理を常にカラム (Column、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。



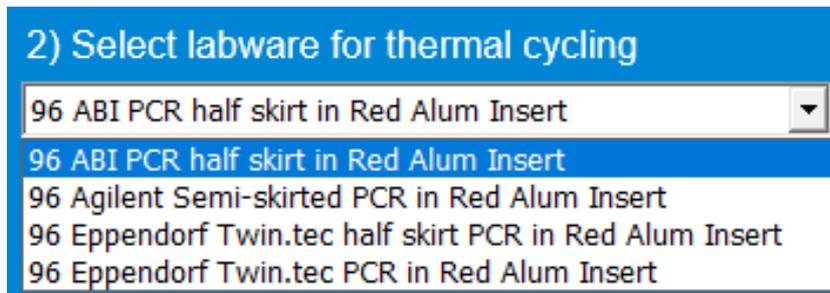
- ・ハイブリダイゼーションのステップ(図 2 参照)では、プレートの各 Row(行、横方向)に異なる種類の SureSelect Capture Library をセットすることができます。調製したアダプター付き DNA ライブラリが適切な SureSelect Capture Library と一致するように実験を計画してください。詳細はハイブリダイゼーションの項目を参照ください。
- ・サンプルインデックスはキャプチャ前の増幅時に付加されます(図 2 参照)。実験を計画する際、それぞれのサンプルに適切なインデックスを割り当て、適切な番号のインデックスプライマーを適切なウェル(サンプル)に割り当てるようにしてください。インデックスプライマーのプレート上の位置は 149 ページの表 118~150 ページの表 121 を参照ください。
- ・キャプチャ前の増幅ステップ(図 2 参照)では、入力 DNA の種類および量によって PCR 増幅サイクル数が異なることがあります。同じ PCR サイクル数となる入力 DNA の種類および量を同じプレートで処理するようにしてください。詳細はキャプチャ前の増幅ステップ 63 ページの表 41 を参照ください。
- ・キャプチャ後の増幅ステップ(図 2 参照)では、キャプチャターゲットのサイズの違いによって PCR 増幅サイクル数が異なることがあります。同じ PCR サイクル数となるターゲットサイズの Capture Library を同じプレートで処理するようにしてください。詳細はキャプチャ後の増幅ステップ 108 ページの表 82 を参照ください。

装置の設置について

- ・ワークフローのハイブリダイゼーションのステップでは、Bravo デッキとサーマルサイクラ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、遠心してスピンド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。

PCRプレートの選択

自動化プロトコルではサーマルサイクラへ PCR プレートを移動する準備として、PCR プレートに試薬を分注するステップが複数あります。これらのステップでは、各プレートに応じた正しい分注作業を行うため、SureSelect XT HS2 フォーム上で使用する PCR プレートの種類を指定する必要があります。自動化プロトコルを開始する前に、使用予定の PCR プレートがサポートされているプレートであることを確認してください。実験で使用する PCR プレートの種類は以下のメニューで指定します。サポートされている PCR プレートの詳細については表 12 をご参照ください。

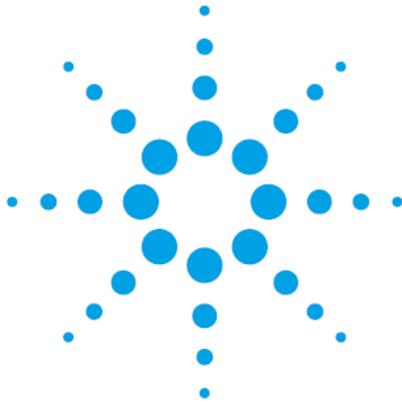


CAUTION

表 12 に記載されているプレートは様々なサーマルサイクラで使用でき、Agilent SureSelect 自動化プログラムでの使用がサポートされています。お使いのサーマルサイクラに適合したプレートであっても、表 12 に記載されていないプレートは使用しないでください。

表 12 サポートされている PCR プレート

Description in VWorks menu	Vendor and part number
96 ABI PCR half-skirted plates (MicroAmp Optical plates)	Thermo Fisher Scientific p/n N8010560
96 Agilent semi-skirted PCR plate	Agilent p/n 401334
96 Eppendorf Twin.tec half-skirted PCR plates	Eppendorf p/n 951020303
96 Eppendorf Twin.tec PCR plates (full-skirted)	Eppendorf p/n 951020401



3 AMPure XP Bead Platesの準備

Step 1. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備	36
Step 2. プレキャプチャ精製用ビーズプレートの準備	38
Step 3. プール後 DNA 濃縮用ビーズプレートの準備 (プレキャプチャプール方式)	40
Step 4. キャプチャ後精製用ビーズプレートの準備	42

この章では、ワークフロー全体の各精製ステップで使用する AMPure XP ビーズプレートの準備について説明します。各精製ステップで異なるプロトコルを使用します。

ワークフローの開始時に AMPure XP ビーズのプレートを準備することで、ステップ間の遅延を抑えます。ただし、複数日にわたって実行する場合は、その日と翌日に使用する AMPure XP ビーズのプレートのみを準備し、必要な日の 1 日以上前に準備しないでください。

Step 1. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備

LibraryPrep_XT_HS2_ILM プロトコルでは、各ウェルに 80 µL のビーズが分注されたビーズプレートが必要です。AMPureXP_Aliquot (Library Prep) プロトコルを使用して、ライブラリの準備に必要なビーズプレートを準備します。

AMPureXP_Aliquot (Library Prep) 用ワークステーションと試薬の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. AMPure XP ビーズが入った Agilent shallow well reservoir を準備します。
 - a. AMPure XP ビーズを室温に戻します。
 - b. ビーズの懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
 - c. ビーズ懸濁液をボトルからリザーバーへ直接注ぎます。リザーバー内のピラミッドが十分満たされるまで注ぎます。サンプル数に応じた列分のピラミッドのみ満たされていれば構いません。

Bravo デッキのセットアップ

4. 表 13 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 13 AMPureXP_Aliquot (Library Prep) 用 Bravo デッキの初期配置

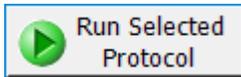
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (Library Prep) の実行

5. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の AMPureXP_Aliquot (Library prep) を選択します。
6. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
9. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



プロトコルの完了に約 5 分かかります。このプロトコルで 80 μ L の AMPure XP ビーズを Agilent shallow well reservoir から Agilent Deep Well plate の各 Well に分注します。

10. プロトコルが完了したら、AMPure XP ビーズが分注された Agilent Deep Well plate を、Bravo デッキの 5 番から取り出します。
11. ビーズプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。LibraryPrep_XT_HS2_ILM protocol (60 ページの表 36) で使用するまで 4°C で保存します。プレートは分注後 24 時間以内に使用します。
分注されずに Agilent shallow well reservoir に残った AMPure XP ビーズはボトルに戻します。

Step 2. プレキャプチャ精製用ビーズプレートの準備

AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) プロトコルでは、各ウェルに 50 μ L のビーズが分注されたビーズプレートが必要です。AMPureXP_Aliquot (Pre-Capture PCR) プロトコルを使用してライブラリの準備に必要なビーズプレートを準備します。

AMPureXP_Aliquot (Pre-Capture PCR) 用ワークステーションと試薬の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. AMPure XP ビーズが入った Agilent shallow well reservoir を準備します。
 - a. AMPure XP ビーズを室温に戻します。
 - b. ビーズの懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
 - c. ビーズ懸濁液をボトルからリザーバーへ直接注ぎます。リザーバー内のピラミッドが十分満たされるまで注ぎます。サンプル数に応じた列分のピラミッドのみ満たされていれば構いません。

Bravo デッキのセットアップ

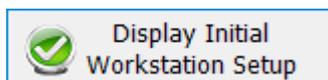
4. 表 14 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 14 AMPureXP_Aliquot (Pre-Capture PCR) 用 Bravo デッキの初期配置

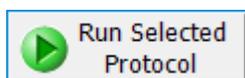
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well Plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (Pre-Capture PCR) の実行

5. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の AMPureXP_Aliquot (Pre Capture PCR) を選択します。
6. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
7. Click Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
9. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



プロトコルの完了に約 5 分かかります。このプロトコルで 50 μ L の AMPure XP ビーズを Agilent shallow well reservoir から Agilent Deep Well plate の各 Well に分注します。

10. プロトコルが完了したら、AMPure XP ビーズが分注された Agilent Deep Well plate を、Bravo デッキの 5 番から取り出します。
11. ビーズプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) protocol (69 ページの表 47 を参照) で使用するまで 4°C で保存します。プレートは分注後、24 時間以内に使用します。
分注されずに Agilent shallow well reservoir に残った AMPure XP ビーズはボトルに戻します

Step 3. プール後DNA濃縮用ビーズプレートの準備(プレキャプチャプール方式)

AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) プロトコルはプレキャプチャプーリングワークフローで使用します。このプロトコルでは各ウェルに 180 μ L のビーズが分注されたプレートを使用します。AMPureXP_Aliquot (Concentration of Pool) を使用してライブラリプールの濃縮のために使用するビーズプレートを準備します。

AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) プロトコルは プレキャプチャプール方式のみ必要です。ポストキャプチャプーリングワークフローの場合には 42 ページの Step 4. キャプチャ後精製用ビーズプレートの準備に進んでください。

AMPureXP_Aliquot (Concentration of Pool) 用ワークステーションと試薬の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. AMPure XP ビーズが入った Agilent shallow well reservoir を準備します。
 - a. AMPure XP ビーズを室温に戻します。
 - b. ビーズの懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
 - c. ビーズ懸濁液をボトルからリザーバーへ直接注ぎます。リザーバー内のピラミッドが十分満たされるまで注ぎます。サンプル数に応じた列分のピラミッドのみ満たされていなければなりません。

Bravo デッキのセットアップ

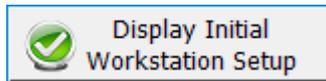
4. 表 15 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 15 AMPureXP_Aliquot (Concentration of Pool) 用 Bravo デッキの初期配置

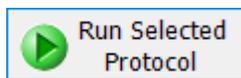
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well Plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (Concentration of Pool) の実行

5. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の AMPureXP_Aliquot (Concentration of Pool) を選択します。
6. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
7. Click Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
9. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



プロトコルの完了に約 5 分かかります。このプロトコルで 50 μ L の AMPure XP ビーズを Agilent shallow well reservoir から Agilent Deep Well plate の各 Well に分注します。

10. プロトコルが完了したら、AMPure XP ビーズが分注された Agilent Deep Well plate を、Bravo デッキの 5 番から取り出します。
11. ビーズプレートは PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。AMPureXP_XT_HS2_ILM (90 ページの表 59 参照) で使用するまで 4°C で保存します。プレートは分注後 24 時間以内に使用します。
分注されずに Agilent shallow well reservoir に残った AMPure XP ビーズはボトルに戻します。

Step 4. キャプチャ後精製用ビーズプレートの準備

The AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) プロトコルでは、各ウェルに 50 μ L のビーズが分注されたビーズプレートが必要です。AMPureXP_Aliquot (Post-Capture PCR) プロトコルを使用して、ライブラリの準備に必要なビーズプレートを準備します。

AMPureXP_Aliquot (Post-Capture PCR) 用ワークステーションと試薬の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. AMPure XP ビーズが入った Agilent shallow well reservoir を準備します。
 - a. AMPure XP ビーズを室温に戻します。
 - b. ビーズの懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
 - c. ビーズ懸濁液をボトルからリザーバーへ直接注ぎます。リザーバー内のピラミッドが十分満たされるまで注ぎます。サンプル数に応じた列分のピラミッドのみ満たされていれば構いません。

Bravo デッキのセットアップ

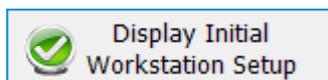
4. 表 16 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 16 AMPureXP_Aliquot (Post-Capture PCR) 用 Bravo デッキの初期配置

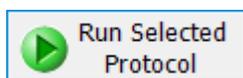
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well Plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (Post-Capture PCR) の実行

5. セットアップフォームの「Select protocol to execute」の AMPureXP_Aliquot (Pre Capture PCR) を選択します。
6. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

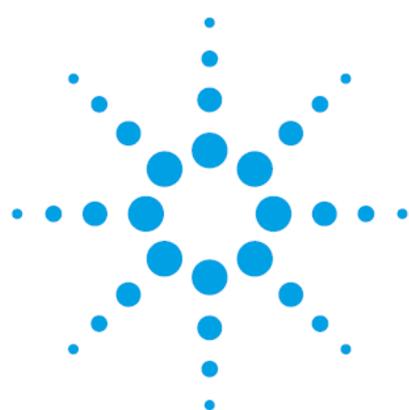


8. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
9. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



プロトコルの完了に約 5 分かかります。このプロトコルで 50 μ L の AMPure XP ビーズを Agilent shallow well reservoir から Agilent Deep Well plate の各 Well に分注します。

10. プロトコルが完了したら、AMPure XP ビーズが分注された Agilent Deep Well plate を、Bravo デッキの 5 番から取り出します。AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) protocol (114 ページの表 88 を参照) で使用するまで 4°C で保存します。プレートは分注後 24 時間以内に使用します。分注されずに Agilent shallow well reservoir に残った AMPure XP ビーズはボトルに戻します。



4 サンプルの調製

Step 1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認	45
Step 2. DNA の断片化.....	47
Step 3. アダプター付加ライブラリの調製	56
Step 4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅	62
Step 5. AMPure XP beads による増幅した DNA の精製.....	68
Step 6. ライブラリ DNA のサイズチェックと定量	71

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントのワークフローの概要は、29 ページの図 2 を参照ください。

この章では、イルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンスプラットフォームでランする DNA ライブラリを、Agilent NGS 自動化システムを用いて調製する方法を説明します。各サンプルにそれぞれのインデックスと分子バーコードを付加します。

ライブラリ調製プロトコルは、fresh もしくは fresh frozen サンプルからの高品質の gDNA だけではなく、FFPE サンプルからの低品質の DNA にも対応しています。FFPE サンプルを使用する場合は、プロトコル全工程において、一部条件を変更する必要があります。FFPE サンプルを使用する際の変更内容のまとめは 134 ページの「7 Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用」をご覧ください。

プロトコルでは、10 ng~200 ng のインプット DNA が必要であり、FFPE サンプルの場合、DNA インプット量や定量方法の調整が必要です。最適なシーケンス結果を得るために、推奨範囲内で、可能な限り最大のインプット DNA を使用してください。DNA インプット量が少ない場合 (10~50 ng) や、小さいプローブデザインで低頻度アレルのバリエーションを検出する際には分子バーコードを用いた解析を推奨します。

Step 1. ゲノムDNAサンプルの調製と品質確認

Freshなサンプル由来の質の高いgDNAの場合

1. キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit など適した方法を用いて、製造元が提供しているプロトコルに従い、高品質の gDNA を調製します。

NOTE

gDNA サンプルが、OD 260 / 280 の値が 1.8~2.0 であり高品質であることを確認してください。

2. Qubit BR dsDNA Assay Kitを使用して、各DNAサンプルの濃度を測定します。Qubit装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。Freshなサンプルから調製したDNAは、その後更なる品質確認操作は不要です。47ページの「方法 1: 自動化システムを用いた酵素による断片化」または54ページの「方法 2. コバリスを用いたDNA断片化」に進んでください。

FFPEサンプル由来のgDNAの調製と品質確認

1. キアゲン社の QIAamp DNA FFPE Tissue Kit と、キアゲン社の Deparaffinization Solution を用いて、製造元が提供しているプロトコルに従い、FFPE 組織片サンプルから gDNA を調製します。最後のステップで、Mini Elute カラムにて、30 μ L の Buffer ATE で gDNA を溶出します(2回)。最終的な溶出液の容量は 60 μ L になります。

NOTE

Proteinase K での 1 時間の分解反応後、組織の溶解が不十分な場合は、さらに Proteinase K を 10 μ L 加え、時々混合しながら、56°Cで継続してインキュベーションします(最大 3 時間まで)。

同じ日にライブラリ調製を行う場合は、精製後のgDNAは氷上に置きます。ライブラリ調製が後日になる場合は、-20°Cに保存します。

2. 以下に示す方法のいずれかを用いて、各 FFPE DNA サンプルの品質(分解度)を確認します。

オプション 1: Agilent NGS FFPE DNA QC Kit を用いる方法(推奨)

Agilent NGS FFPE DNA QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を定めることができます。 $\Delta\Delta$ Cq 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨内容は表 17 を参照ください。

- a. Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- b. 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μ L を、Agilent NGS FFPE DNA QC Kit 測定用に分注します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- c. $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコア \leq 1 のサンプルは、すべて step a での Qubit に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。
- d. $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコア $>$ 1 のサンプルは、すべて Agilent NGS FFPE DNA QC Kit より得ら

4 サンプルの調製

れる qPCR に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。

表 17 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS2 における DNA インプット量の決定

Protocol Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples	
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
DNA input for Library Preparation	10 ng to 200 ng DNA, based on Qubit Assay	10 ng to 200 ng DNA, based on Qubit Assay	10 ng to 200 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification

* $\Delta\Delta Cq$ が 1 以下の FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。10 ~ 200 ng に必要な容量を計算するには qPCR による DNA 濃度ではなく、Qubit で測定した濃度を使用します。

オプション 2: Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay から得られる DIN を用いる方法

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

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μ L を分取し、Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay を用いて分析します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- DIN の値をもとに、表 18 の内容を参照して各サンプルのインプット量を決定してください。

表 18 DNA Integrity Number (DIN) の値に基づく、SureSelect XT HS2 における DNA インプット量の決定

Protocol Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		DIN > 8*	DIN 3–8	DIN < 3
DNA input for Library Preparation	10 ng to 200 ng DNA, quantified by Qubit Assay	10 ng to 200 ng DNA, quantified by Qubit Assay	Use at least 15 ng for more intact samples and at least 40 ng for less intact samples. Use the maximum amount of DNA available, up to 200 ng, for all samples. Quantify by Qubit Assay.	Use at least 50 ng for more intact samples and at least 100 ng for the least intact samples. Use the maximum amount of DNA available, up to 200 ng, for all samples. Quantify by Qubit Assay.

* DIN が 8 より大きい FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。

NOTE

DNA の品質は推奨の PCR サイクル数に影響します。異なる PCR サイクル数のサンプルは異なる回にライブラリ調製を行ってください。

Step 2. DNAの断片化

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントワークフローでは DNA の断片化に 2 種類の方法を使用することができます。

- ・ 方法 1 自動化システムを用いた酵素による断片化(47 ページ)
- ・ 方法 2 コバリスを用いた機械的切断によるマニュアルでの断片化(54 ページ)

選択したプロトコルに応じて適切なプロトコルを参照してください。

方法1: 自動化システムを用いた酵素による断片化

方法1では EnzFrag_XT_HS2_ILM のプロトコルを使用し、酵素による断片化を行います。リキッドハンドリング操作の完了後に、PCR プレートにサーマルサイクラに移し、インキュベーションを行い、その後、再度 Bravo デッキに PCR プレートを戻し、EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM プロトコルを用いて 50 µL 容量になるよう、サンプルの希釈を行います。

この方法では表 19 の試薬を使用します。使用前に試薬を溶解し、表に記載の方法で混合してから使用します。ランを開始する前に、DNA サンプルを除く Fragmentation マスターミックスを、余剰分を含め調整する必要があります。表 22 に 1, 2, 3, 4, 6, 12 カラム分のサンプル数の場合の液量が記載されています。

表 19 プロトコル前に溶解が必要な試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
5X SureSelect Fragmentation Buffer (blue cap)	SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit, -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	48 ページ
SureSelect Fragmentation Enzyme (green cap)	SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit, -20°C	Place on ice just before use	Inversion	48 ページ

EnzFrag_XT_HS2_ILM 用 Workstation の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. チラーの電源を入れ、0°Cにセットします。Bravo デッキ 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
4. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 4°Cに設定してください。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番にセットします。

4 サンプルの調製

酵素断片化用のサーマルサイクラの準備

- サーマルサイクラのプログラムを表 20 のように設定します。スタートボタンを押し、すぐに Pause ボタンを押します。

表 20 酵素による断片化のサーマルサイクルプログラム*

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	表 21 を参照
Step 2	65°C	5 minutes
Step 3	4°C	Hold

*サーマルサイクルプログラムの反応液量は 10 µL に設定してください。

断片化条件は、NGS のリード長によって異なります。下の表 21 を参照し、サンプルタイプと設定予定の NGS リード長に適した 37°C のインキュベーション時間を選択してください。

表 21 サンプルタイプと NGS リード長別の断片化時間

NGS read length requirement	Target fragment size	Duration of 37°C incubation step	
		High-quality DNA samples	FFPE DNA samples
2 × 100 reads	150 to 200 bp	25 minutes	25 minutes
2 × 150 reads	180 to 250 bp	15 minutes	25 minutes

断片化用のサンプルプレートの準備

- PCR プレートに液量が 15 µL となるように 10 ng ~ 200 ng の gDNA を分注します。PCR プレートは使用するサーマルサイクラに対応したものを使用します。DNA インプット量については表 17 または (FFPE サンプル由来の DNA の場合は表 18) を参照してください。

Fragmentation マスターミックスの調製

- 表 22 を参照し、Fragmentation マスターミックスを調製します。
ピペティングを 20 回行うか、チューブに蓋をして高速で 5 ~ 10 秒ボルテックスしよく混合します。
泡を除くために軽くスピンドウンし氷上に置きます。

表 22 Fragmentation マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	97.8 µL	136.0 µL	253.8 µL
5X SureSelect Fragmentation Buffer (blue cap)	2 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	97.8 µL	136.0 µL	253.8 µL
SureSelect Fragmentation Enzyme (green cap)	1 µL	21.3 µL	29.8 µL	38.3 µL	48.9 µL	68.0 µL	126.9 µL
Total Volume	5 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	244.5 µL	340.0 µL	634.5 µL

マスターミックスソースプレートの準備

- 表 23 に従い、Eppendorf twin.tec プレートのカラム 1 の全てのウェルに Fragmentation マスターミックスを分注します。プロトコルを実行する直前までソースプレートは氷上に置いておきます。マスターミックスソースプレートの最終的な配置は図 3 を参照ください。

表 23 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Fragmentation master mix	Column 1 (A1-H1)	12.5 μ L	17.5 μ L	22.5 μ L	28.8 μ L	40.0 μ L	75.0 μ L

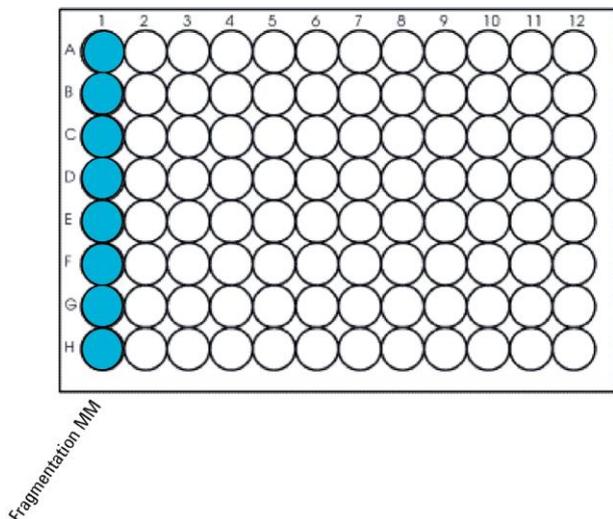


図 3 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの配置

- マスターミックスソースプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。
- プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドアウンし気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo で正確に容量が測れないことがあります。必ずランを始める前にソースプレートをシールしスピンドアウンしてください。

ワークステーションの準備

- 表 24 に従い、Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 24 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	New tip box	—	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	—	—	Empty tip box

4 サンプルの調製

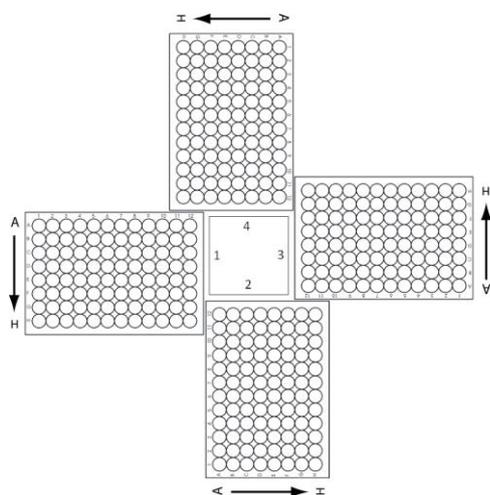


図 4 Agilent Labware MiniHub プレーットの向き

13. 表 25 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 25 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	gDNA samples in PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)
5	Empty Eppendorf twin.tec plate
9	Fragmentation master mix source plate, unsealed

14. 表 26 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

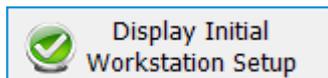
表 26 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

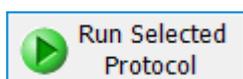
EnzFrag_XT_HS2_ILM の実行

15. セットアップフォームの Select set up form for execute から EnzFrag_XT_HS2_ILM を選択します。
16. Select labware for thermal cycling では Bravo デッキ 4 番にセットした PCR プレーートを選択します。
17. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。

18. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

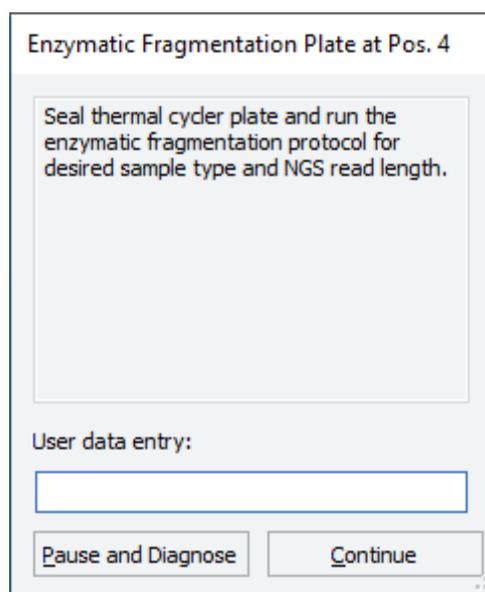


19. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
20. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
21. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



EnzFrag_XT_HS2_ILM の実行には約 10 分かかります。完了すると、サンプルは断片化の準備が完了し状態となります。(断片化反応は事前に準備したサーマルサイクラで行います。)断片化反応にかけるサンプルは Bravo デッキの 4 番の PCR プレートに入った状態になります。

22. 以下の指示が表示されたら Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。



23. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。
24. すぐにサンプルプレートをサーマルブロックに移し、蓋を閉めて表 20 のプログラムを開始します。
25. Bravo デッキ 9 番から Fragmentation マスターミックスソースプレートとして使用した Eppendorf twin.tec プレートを取り出します。このプレートを再度 64 ページのキャプチャ前 PCR マスターミックスとマスターミックスソースプレートの調製で使用することができます。

EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM 用ワークステーションの準備

26. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。

4 サンプルの調製

27. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。

28. red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番にセットします。

サンプル希釈用 Water reservoir の準備

29. 30 mL の nuclease-free water を入れた Agilent shallow well reservoir を準備します。リザーバー内の nuclease-free water に気泡がないことを確認します。プロトコルの後 Water リザーバーは LibraryPrep_XT_HS2_ILM runset と AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR) でも使用します。

ワークステーションの準備

30. 表 27 に従い、Labware MiniHub にプレート等をセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 27 EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from Step 29	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	—	—	—

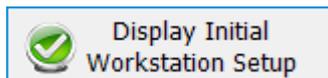
31. 表 28 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 28 EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

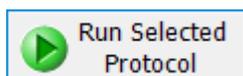
Location	Content
2	New tip box
4	PCR plate containing fragmented DNA samples seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)
5	Empty Eppendorf twin.tec plate (if the PCR plate at position 4 is not an Eppendorf twin.tec PCR plate) OR Empty (if the PCR plate at position 4 is an Eppendorf twin.tec PCR plate)
8	Empty tip box

EnxFrag_Dil_XT_HS2_ILM の実行

32. セットアップフォームの「Select protocol to execute」の EnxFrag_Dil_XT_HS2_ILM を選択します。
33. セットアップフォームの「Select labware for thermal cycling」で Bravo デッキ 4 番にセットしたプレートを選択します。
34. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
35. Display Initial Workstation Setup をクリックします



36. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
37. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
38. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



プロトコルの完了に約 5 分かかります。完了したサンプルはライブラリ調製に使用することができます。サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

NOTE

このステップは stopping point ではありません。ライブラリ調製前の断片化サンプルの評価はせずに、56 ページの Step 3. アダプター付加ライブラリの調製に進んでください。

方法 2. コバリスを用いたDNA断片化

この方法では質の高い gDNA あるいは FFPE 由来 gDNA をそれぞれに適した条件で、50 μ L の液量で切断します。ターゲット断片化サイズとそれに対応した断片化条件は NGS のリード長により異なります。表 29 をご参照ください。詳細な切断条件は表 30 にあります。

表 29 NGS リード長別のコバリスでの切断時間

NGS read length requirement	Target fragment size	Shearing duration for high-quality DNA samples	Shearing duration for FFPE DNA samples
20 × 100 reads	150 to 200 bp	2 × 120 seconds	240 seconds
20 × 150 reads	180 to 250 bp	2 × 60 seconds	240 seconds

NOTE

本プロトコルは、Covaris model E220 装置と 130 μ L Covaris microTUBE により条件が最適化されています。他の Covaris 装置やサンプルホルダーを用いる場合、ターゲットサイズの DNA 断片が得られる条件について、装置取り扱い会社にお問い合わせください。

1. コバリス E220 を起動します。操作の詳細は、コバリス社のユーザーガイドを参照ください。
 - a. 製造元の推奨に従い、最適な高さまで脱イオン水をコバリスのタンクに注ぎます。
 - b. チューブのガラス部分が水で覆われているか確認してください。
 - c. コントロールパネル上で、Degas(脱ガス)ボタンを押します。製造元の推奨に従い装置の脱気を行います。(通常 30~60 分ほどです。)
 - d. コバリスのウォーターバス内の水温表示が 5°Cになるように、外部循環冷却装置の水温を 2~5°Cの間に設定します。凍結防止用のクーラント液の添加については、メーカーの推奨事項を参照してください。
2. 断片化を行う 10~200 ng の gDNA サンプルを 1x Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5-8.0, 0.1mM EDTA) で 50 μ L に調製します。
FFPE 由来 DNA の DNA 品質に基づいたインプット量のガイドラインは表 17 または表 18 を参照ください。

NOTE

断片化する DNA を水で希釈しないでください。 水に溶解したサンプルを断片化すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が下がります。

3. ボルテックスでよく混合し、液を集めるため軽くスピンドウンします。サンプルは氷上に置いてください。
4. 各 gDNA サンプルを、下記の手順にて断片化します。
先がテーパ状になったピペットチップを用い、gDNA サンプルを 50 μ L ずつ、Covaris 96 micro TUBE Plate にフویلシールを突き破って移します。分注後、プレートを付属のフویلシールでシールします。
 - e. 96 micro TUBE Plate を 30 秒間遠心し、液を底に集め、底部にある泡を取り除きます。microTUBE 内に泡が残らないように注意してください(泡は超音波による gDNA の断片化を阻

害します)。

- f. サンプルを入れた 96 micro TUBE Plate をコバリスのローディングトレイにセットし、表 30 の設定に従い、gDNA の断片化を行います。

表 30 コバリス E シリーズ装置による断片化設定条件 (SonoLab software v7 以降)

Setting	High-quality DNA for 2 × 100 read NGS	High-quality DNA for 2 × 150 read NGS	FFPE DNA (2 × 100 or 2 × 150 read NGS)
Duty Factor	10%	10%	10%
Peak Incident Power (PIP)	175	175	175
Cycles per Burst	200	200	200
Treatment Time	2 × 120 seconds	2 × 60 seconds	240 seconds
Bath Temperature	2° to 8° C	2° to 8° C	2° to 8° C

高品質 DNA のみ、下記の手順にて 2 段階で断片化を実施してください。

- 120 秒断片化します。
 - 96 microTUBE Plate を 10 秒間遠心します。
 - さらに 120 秒断片化します。
 - 96 microTUBE Plate を 10 秒間遠心します。
- g. フォイルシールを突き破ってピペットチップの先端を差し込み、断片化 DNA 全量をピペットを用いてゆっくり吸引します。
- h. 断片化されたサンプル全量(約 50 µL)を、Eppendorf twin.tec 96-wellplate に移しますサンプルは氷上に置きます。
- i. DNA サンプルを移した後、96 micro TUBE Plate を遠心し、残存したサンプルを集めます。チューブ内に残ったサンプルをできるだけ回収し、step g のチューブに移します。

NOTE

このステップでは、特に少量の DNA サンプルを取り扱う時、インプット DNA のロスを避けることが重要です。microTUBE の中を見て、すべてのサンプルを移したことを確認してください。もし水滴が残っていたら step i を繰り返してください。

4 サンプルの調製

Step 3. アダプター付加ライブラリの調製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムは SureSelect ターゲットエンリッチメントに必要な末端修復、dA 付加、分子バーコード付加を含む DNA 末端修飾ステップを行います。末端修飾後、Agilent NGS 自動化システムは AMPure XP ビーズを使用して DNA 精製を行います。

このステップでは表 31 に示す試薬を使用します。使用前に表 31 に従い各試薬を溶解、混合してください。自動ランを開始する前に、各ステップの DNA サンプルを除くマスターミックス(余剰分を含む)を調製する必要があります。1, 2, 3, 4, 6, および 12 カラムに対応した各ランに必要なマスターミックスがそれぞれの表に示されています。

また、このステップでは 36 ページで準備した、AMPure XP ビーズが分注されたプレートを使用します。

表 31 使用前に溶かしておく試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	57 ページ
Ligation Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	58 ページ
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	57 ページ
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	58 ページ
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix (white cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	58 ページ

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 79°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
3. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 6 番の温度をあらかじめ 4°C に設定します。Bravo デッキ 6 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。
4. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキ 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。

末端修復/dA 付加マスターミックスの調製

1. 表 32 に従い適切な量の末端修復/dA 付加マスターミックスを調製します。試薬の混合やピペッティング作業は各項目の指示に従ってください。
 - a. 溶解した End Repair-A Tailing Buffer を高速のボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌し均一にします。溶液を目視で確認し、固形物がある場合は完全に溶解するまでボルテックスミキサーによる攪拌を続けます。

CAUTION

このステップで使用する End Repair-A Tailing Buffer は、分注する前に必ず高速のボルテックスミキサーで均一になるまで攪拌する必要があります。他の溶液と混合するときは、混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15~20 回繰り返してよく混合します。

- b. End Repair-A Tailing Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ、1.5 mL エッペンドルフチューブまたはコニカルチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。
- c. End Repair-A Tailing Enzyme Mix をゆっくり加えた後、buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15~20 回繰り返してよく混合します（容量が大きい場合は、均一になるまで 25~30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌します）。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集め、氷上に置きます。

表 32 末端修復/dA 付加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
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	16 µL	204 µL	340 µL	476 µL	612 µL	884 µL	1836 µL
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µL	51 µL	85 µL	119 µL	153 µL	221 µL	459 µL
Total Volume	20 µL	255 µL	425 µL	595 µL	765 µL	1105 µL	2295 µL

4 サンプルの調製

ライゲーションマスターミックスの調製

1. 表 33 に従い、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。試薬の混合やピペッティング作業は各項目の指示に従ってください。

- a. 溶解した Ligation Buffer を高速のボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌し均一にします。

CAUTION

このステップで使用される Ligation Buffer は粘性が非常に高いです。Master Mix の調製の前に、高速のボルテックスミキサーで 15 秒間混合します。他の溶液と混合する際は混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15~20 回繰り返して、よく混合してください。

- b. Ligation Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ、1.5 mL エッペンドルフチューブまたはコンカルチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。
- c. T4 DNA Ligase をゆっくり加えた後 buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15~20 回繰り返してよく混合します（容量が大きい場合は、均一になるまで 25~30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌します）。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集めます。

表 33 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 Buffer (purple cap or bottle)	23 µL	293.3 µL	488.8 µL	684.3 µL	879.8 µL	1270.8 µL	2737 µL
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	110.5 µL	238 µL
Total Volume	25 µL	318.8 µL	531.3 µL	743.8 µL	956.3 µL	1381.3 µL	2975 µL

Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製

1. 表 34 に従い、Adaptor Oligo Mix 希釈液を調製します。ボルテックスミキサーでよく混合し、氷上に置きます。

表 34 Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µL	42.5 µL	63.8 µL	85.0 µL	106.3 µL	143.5 µL	276.3 µL
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix (white cap)	5 µL	85.0 µL	127.5 µL	170.0 µL	212.5 µL	287.0 µL	552.5 µL
Total Volume	7.5 µL	127.5 µL	191.3 µL	255.0 µL	318.8 µL	430.5 µL	828.8 µL

マスターミックスソースプレートの調製

1. Agilent Deep Well プレートにステップからで調製したマスターミックスを含むマスターミックスソースプレートを調製します。表 35 に示す容量の各マスターミックスを Agilent Deep Well プレートの各カラムの全てのウェルに加えます。このマスターミックスソースプレートの最終的な配置は図 5 に示します。

表 35 LibraryPrep_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Agilent Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
End Repair-dA Tailing master mix	Column 1 (A1-H1)	31.0 μ L	52.0 μ L	73.0 μ L	94.0 μ L	136.0 μ L	280.0 μ L
Ligation master mix	Column 2 (A2-H2)	36.0 μ L	62.0 μ L	88.0 μ L	114.0 μ L	166.0 μ L	360.0 μ L
Adaptor Oligo Mix dilution	Column 3 (A3-H3)	15.0 μ L	22.5 μ L	30.0 μ L	37.5 μ L	52.5 μ L	101.3 μ L

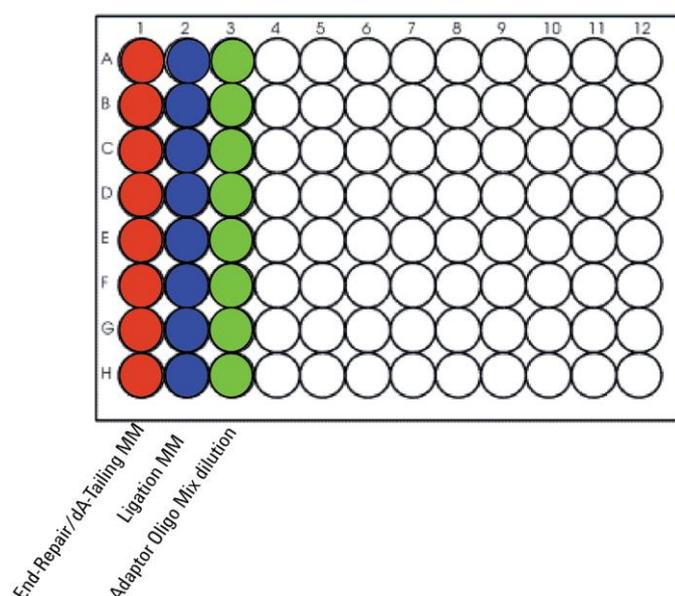


図 5 LibraryPrep_XT_HS2_ILM 用のマスターミックスソースプレートの配置

2. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
3. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo で正確に容量が測れないことがあります。必ずランを始める前にソースプレートをシールしスピンドウンしてください。

精製用試薬の準備

1. 30 mL の水を入れた Agilent shallow well reservoir を用意します。EnzFrag_Dil_XT_HS2_ILM プロトコルで使用した同様の Reservoir を再利用するか、新しく用意します。リザーバー内の水中に気泡がないことを確認します。気泡がある場合はピペットチップで取り除いてください。このリザーバーは自動化ランの完了後に AMPureXP_XT_HS2_ILM プロトコルで使用します。
2. 50 mL の 70%エタノールを入れた、Agilent deep well reservoir を準備します。

4 サンプルの調製

ワークステーションへのセット

1. 表 36 に従い、Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 36 LibraryPrep_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Aliquoted AMPure XP beads in Agilent deep well plate from page 36 (80 μ L of beads/well)	—	—	—
Shelf 4	Empty Eppendorf twin.tec plate	—	—	—
Shelf 3	Empty Eppendorf twin.tec plate	Empty Eppendorf twin.tec plate	—	—
Shelf 2	New tip box (or box from protocol EnzFrag_XT_HS2_ILM)	Nuclease-free water reservoir from step 1	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box (or box from protocol EnzFrag_XT_HS2_ILM)	70% ethanol reservoir from step 2	—	Empty tip box

2. 表 37 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。

表 37 LibraryPrep_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
4	Empty red insert
6	Empty Eppendorf twin.tec plate
7	Eppendorf plate containing sheared gDNA samples
9	Library Prep master mix source plate, unsealed

3. 表 38 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

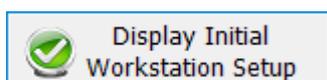
表 38 LibraryPrep_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	2 Tip boxes	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	3 Tip boxes	—	—	—

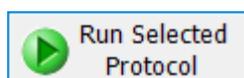
6	4 Tip boxes	–	–	–
12	7 Tip boxes	–	–	–

LibraryPrep_XT_HS2_ILMの実行

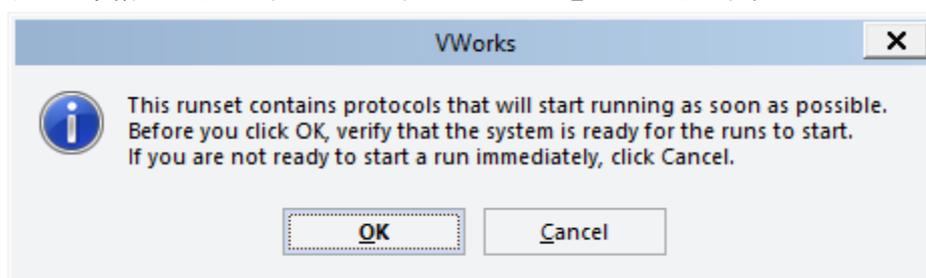
4. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から **LibraryPrep_XT_HS2_ILM** を選択します。
5. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
6. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



7. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
8. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
9. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



10. ランの準備ができれば、以下のウィンドウの OK をクリックします。



LibraryPrep_XT_HS2_ILM runset の実行には約 2 時間かかります。完了すると精製されたアダプター付加 DNA ライブラリは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf プレートの中に入っています。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをしールし 4°Cで一晩、さらに長期保存の場合は-20°Cで保存してください。MiniHub の Shelf2 のカセット 3 から AMPure XP ビーズが入った Agilent Deep Well ソースプレート取り出し、しールをして 4°Cで保存してください。

4 サンプルの調製

Step 4. アダプター付きDNAライブラリの増幅

このステップでは自動化システムでアダプター付き DNA サンプルの増幅とデュアルインデックス付加用の試薬の分注・混合を行います。自動化システムが動作を完了したら、PCR プレートにサーマルサイクラに移し、増幅反応を行います。

このステップでは表 39 の試薬を使用します。開始前に表に記載されている試薬を溶解し、氷上に置きます。各試薬は使用前に表に従って混合してください。

表 39 キャプチャ前 PCR 増幅に使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	64 ページ
5x Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	64 ページ
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR),* -20°C	Vortexing	63 ページ

* Indexing primer pairs are provided in a 96-well plate.

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、PCR マスターミックスはラボで決められたクリーンエリアもしくは UV 滅菌灯を備えた PCR フード内で陽圧の環境下で調製してください。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. チラーの電源を入れ、0°Cにセットします。Bravo デッキ 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
4. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 6 番の温度をあらかじめ 4°Cに設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。

サーマルサイクラの準備

1. 表 40 のプログラムをサーマルサイクラに設定します(蓋は加熱します)。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおして蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 40 キャプチャ前 PCR 増幅用サーマルサイクラのプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	8 to 14, based on input DNA quality and quantity (表 41 参照)	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

* サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 50 µL に設定してください。

表 41 推奨キャプチャ前 PCR サイクル数

Quality of Input DNA	Quantity of Input DNA	Cycles
Intact DNA from fresh sample	100 to 200 ng	8 cycles
	50 ng	9 cycles
	10 ng	11 cycles
FFPE sample DNA	100 to 200 ng*	11 cycles
	50 ng	12 cycles
	10 ng	14 cycles

*qPCR で決定した DNA 量または DIN の値を基にした DNA 量

SureSelect XT HS2Index Primer Pairの準備

1. マルチチャンネルピペットを用いて 5 µL の SureSelect XT HS2 Index Primer Pair をキャプチャ前 PCR で使用するプレートに分注します。同じウェル位置に分注するようにします。PCR プレートは氷上に保管します。プライマーペアが分注された PCR プレートは the Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM プロトコルで使用する際に Bravo デッキにセットします。

4 サンプルの調製

キャプチャ前PCRマスターミックスとマスターミックスソースプレートの調製

1. 表 42 に従い、適切なキャプチャ前 PCR マスターミックスを調製します。ボルテックスミキサーで 15～20 秒混合し、氷上に置きます。

表 42 キャプチャ前 PCR 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
5x Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340µL	425 µL	574 µL	1066 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17 µL	25.5 µL	34 µL	42.5 µL	57.4 µL	106.6 µL
Total Volume	11 µL	187 µL	280.5 µL	374µL	467.5 µL	631.4 µL	1172.6 µL

2. EnzFrag_XT_HS2_ILM protocol で使用した Eppendorf twin.tec master mix source プレートと同じプレートに、表 43 に示された量の PCR master mix をカラム 2 の全てのウェルに加ええます。新しいプレートを用意する場合でも、カラム 2 の全てのウェルに分注します。マスターミックスソースプレートの最終的な配置は図 6 を参照ください。

表 43 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Pre-Capture PCR Master Mix	Column 2 (A2-H2)	22 µL	33 µL	44 µL	55 µL	77 µL	143 µL

CAUTION

プレキャプチャ PCR master mix はかならずソースプレートのカラム 2 に分注してください。

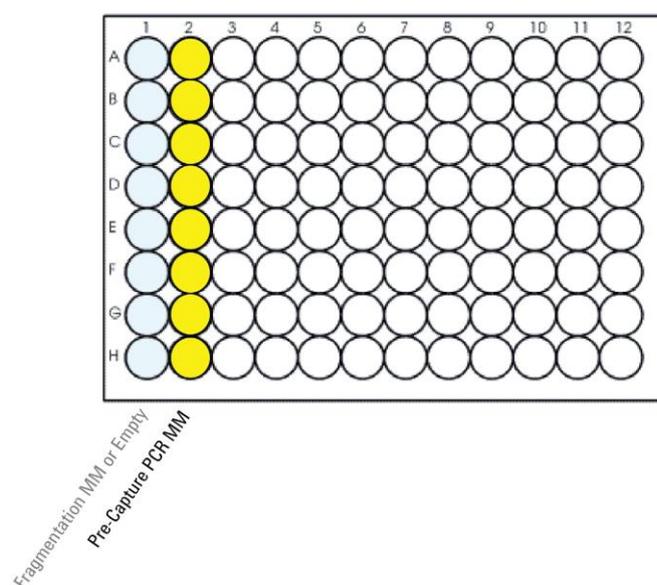


図 6 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートの配置
以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています。

3. マスターミックスソースプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。
4. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドアウンし気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo で正確に容量が測れないことがあります。必ずランを始める前にソースプレートをシールしスピンドアウンしてください。

ワークステーションへのセット

1. 表 44 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 44 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	New tip box	—	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	—	—	Empty tip box

2. 表 45 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。

表 45 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
6	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM in PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
7	Adaptor-ligated DNA samples in Eppendorf twin.tec plate
9	Master mix plate containing PCR master mix in column 2 (unsealed)

4 サンプルの調製

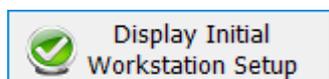
3. 表 46 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 46 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

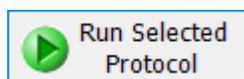
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

Pre-CapPCR_XT_HS2_ILMの実行

4. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM を選択します。
5. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択します。
6. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

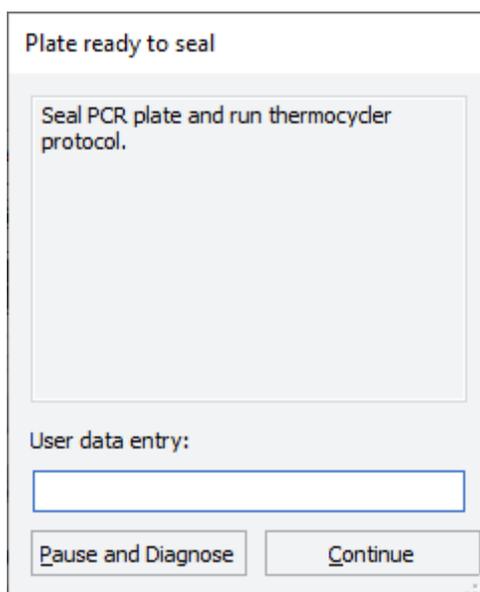


8. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
9. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
10. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM protocol の実行には約 15 分かかります。完了すると、PCR にかけるサンプルが Bravo デッキ 6 番の PCR プレートに入った状態になります。

11. 以下の指示が表示されたら Bravo デッキ 6 番から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。



12. プレートに 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。
13. プログラムをセットしたサーマルサイクラにサンプルを移す前にサーマルサイクラの Play ボタンを押し、表 40 のプログラムを開始しブロックの温度を 98°C にします。98°C に到達したらすぐにサンプルプレートにサーマルサイクラのブロックにセットし蓋を閉めます。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度は高く、やけどをする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

Step 5. AMPure XP beadsによる増幅したDNAの精製

このステップでは Agilent NGS 自動化システムで AMPure XP ビーズと増幅した DNA を Agilent Deep Well Plate に移し、ビーズに結合した DNA を集め洗浄する操作を実行します。

このステップでは 38 ページで準備した AMPure XP beads を使用します。

ワークステーションの準備

1. Bravo デッキ 9 番に残っている Pre-capture PCR master mix を分注した Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートは、後の TS_D1000 protocol で使用します(71 ページの Option1: Agilent 4200 TapeStation と D1000 アッセイを使用する場合を参照)。それ以外の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 45°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
4. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 6 番の温度をあらかじめ 4°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. 30 mL の nuclease free water の入った Agilent shallow well reservoir を準備します。EnzFrag_XT_HS2_ILM protocol および LibraryPrep_XT_HS2_ILM runset で使用したプレートを再利用できます。
リザーバー内の nuclease-free water に気泡がないことを確認します。ある場合はピペットチップ等で取り除きます。
6. 50 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。
7. 表 47 に従い、Labware MiniHub にプレート等をセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 47 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Aliquotted AMPure XP beads in Agilent Deep Well plate from page 38 (50 µL of beads/well)	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty Eppendorf twin.tec Plate	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 5	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 6	—	Empty tip box

8. 表 48 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 48 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
9	Amplified DNA libraries in unsealed PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

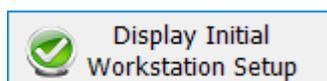
9. 表 49 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 49 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) 用 BenchCel の初期配置

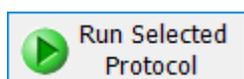
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR) プロトコルの選択と実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) のうちいずれかのプロトコルを選択します。
 - ・ ポストキャプチャプーリングワークフローを行う場合(プローブとのハイブリダイゼーション後にサンプルをプールする場合)AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR -SinglePlex) を選択します。
 - ・ プレキャプチャプーリングワークフローを行う場合(ハイブリダイゼーション反応前にサンプルをプールする場合)AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR - MultiPlex) を選択します。single-plex と multi-plex プロトコルでは溶出の際の液量が異なります。以降のハイブリダイゼーションのプロトコルに応じて正しいオプションを選択してください。
2. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 9 番にセットした PCR プレートを選択します。
3. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
4. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



5. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
6. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
7. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



精製プロトコルの実行には約 45 分かかります。完了すると精製された DNA サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

Step 6. ライブラリDNAのサイズチェックと定量

サンプル解析は以下のオプションから選択できます。

- ・ **Option 1:** 分析用のプレートを自動化システム (TS_D1000) を用いて準備し、4200 TapeStation を用いて行う (71 ページの Option 1: Agilent 4200 TapeStation と D1000 アッセイを使用する場合を参照)
- ・ **Option 2:** 手動で分析サンプルを調製し、Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent 4200 / 4150 TapeStation、または Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer で分析を行う (76 ページの Option 2: その他のプラットフォームを用いた解析 (マニュアル) を参照)

Option 1: Agilent 4200 TapeStationとD1000アッセイを使用する場合

ここでは 2 μ L の DNA サンプルと 6 μ L の D1000 Sample buffer を混合し、D1000 アッセイ用サンプルプレートを、自動化プロトコル TS_D1000 を用いて調製します。調製後、アッセイプレートを 4200 TapeStation に移し解析を行います。詳細は別途 D1000 Kit のマニュアルをご参照ください。TapeStation 分析用試薬は 30 分以上室温に戻してから使用します。

ワークステーションと Sample Buffer ソースプレートの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキの 9 番を室温に戻すためチラーの電源を切ります (21 ページ参照)。
4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. EnxFrag_XT_HS2_ILM と Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM で使用した Eppendorf twin.tec ソースプレートと同じプレートを用い、Sample Buffer ソースプレートを室温で調製します。表 50 に従い、カラム 3 の各ウェルに D1000 Sample Buffer を加えます。

表 50 TS_D1000 用 Sample Buffer ソースプレートの調製

Solution	Position on Source Plate	Volume of Sample Buffer added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
D1000 Sample Buffer	Column 3 (A3-H3)	11.0 μ L	17.0 μ L	23.0 μ L	29.0 μ L	41.0 μ L	77.0 μ L

CAUTION

D1000 Sample Buffer はかならずソースプレートのカラム 3 に分注してください。

4 サンプルの調製

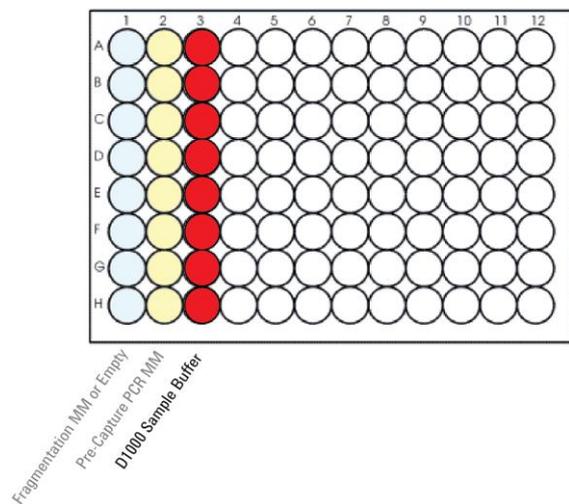


図 7 TS_D1000 用 Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートの配置
以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています。

ワークステーションの準備

- 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 51 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 51 TS_D1000 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	New tip box	—	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	—	—	Empty tip box

- 表 52 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 52 TS_D1000 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Amplified pre-capture libraries in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty Eppendorf twin.tec plate
9	Eppendorf twin.tec source plate containing D1000 Sample Buffer in Column 3

CAUTION

Agilent 4200 TapeStation と自動化システムへのダメージを避けるため、アッセイプレートの調製の自動化には指定の Eppendorf twin.tec プレート (Eppendorf 型番 951020401 または 951020619) のみ使用してください。自動化プロトコルで調製したサンプルプレートを 2200 TapeStation の解析には使用しないでください。

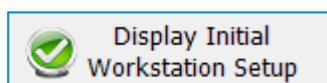
- 表 53 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 53 TS_D1000 用 BenchCel の初期配置

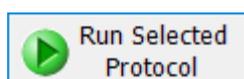
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

TS_D1000 プロトコルの実行

9. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から TS_D1000 を選択します。
10. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
11. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

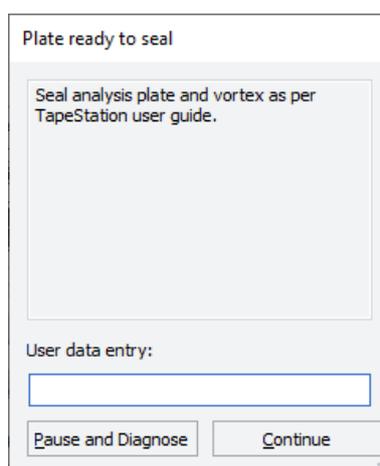


12. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
13. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
14. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



TS_D1000 の実行には約 15 分かかります。解析用のサンプルを分取が完了後、Bravo デッキ 4 番にある DNA ライブラリサンプルプレートにシールし、79 ページのハイブリダイゼーションのセットアップで使用するまで氷上に置きます。

15. 以下の指示が表示されたら、Bravo デッキ 6 番にある解析用サンプルが入った Eppendorf twin.tec プレートを取り出し、Continue をクリックしてください。D1000 アッセイプレートをフویلシールでシールし、ユーザーガイドに従ってボルテックスミキサで混合してください。

**CAUTION**

4200 TapeStation へのダメージを避けるため、指定の 96-well plate foil seals (Agilent 型番 5067-5154) のみを使用してください。

正確な定量のため、DNA と Sample buffer はボルテックスミキサで 1 分間混合し、完全に混合されていることを確認してください。その後、液を集めるためスピンドアウンをしてください。

D1000 アッセイでの泳動とデータの解析

16. ユーザーガイドに従い、解析用サンプルプレート、D1000 ScreenTape、Loading tips を装置にセットし、泳動を開始します。
17. 泳動終了後、エレクトロフェログラムで期待される DNA フラグメントサイズのピークが得られているか確認します(表 54 のガイドラインを参照ください)。2 x 100 bp リード用に断片化された DNA から作製されたライブラリのエレクトロフェログラム例は図 8(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 9(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)および図 10(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。
目的とされるピーク以外に低分子領域にピークが生じている場合、アダプターダイマーの存在が示唆されます。図 10 と同程度に占められている割合が低い場合は、ターゲットエンリッチメントの工程に進むことができます。その他については 157 ページのトラブルシューティングガイドを参照ください。

表 54 キャプチャ前ライブラリの定性ガイドライン

NGS read length for fragmentation protocol selection	Fragmentation method	Input DNA type	Expected library DNA fragment size peak position
2 x 100 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	300 to 400 bp
		FFPE DNA	200 to 400 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	300 to 400 bp
		FFPE DNA	200 to 400 bp
2 x 150 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	330 to 450 bp
		FFPE DNA	200 to 450 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	330 to 450 bp
		FFPE DNA	200 to 450 bp

18. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

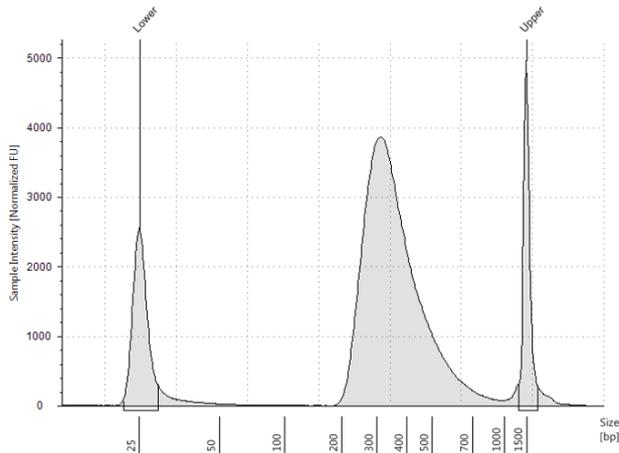


図 8 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図(D1000 アッセイ)

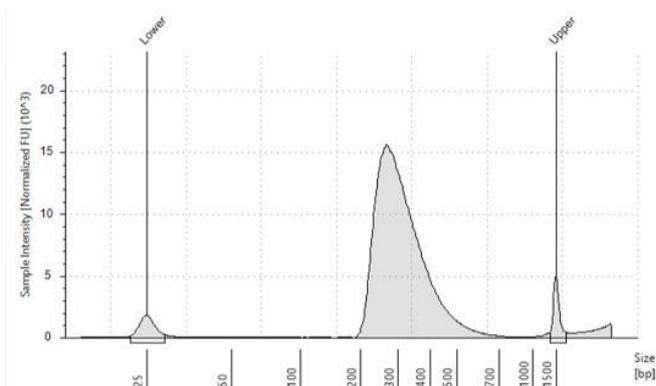


図 9 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図(D1000 アッセイ)

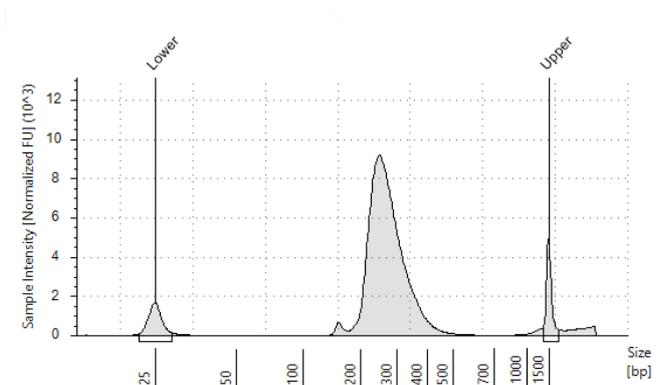


図 10 低品質 FFPE gDNA サンプル(コバリスによる断片化)から調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図(D1000 ScreenTape アッセイ)

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし 4°Cで一晩、さらに長期保存の場合は-20°Cで保存してください。

4 サンプルの調製

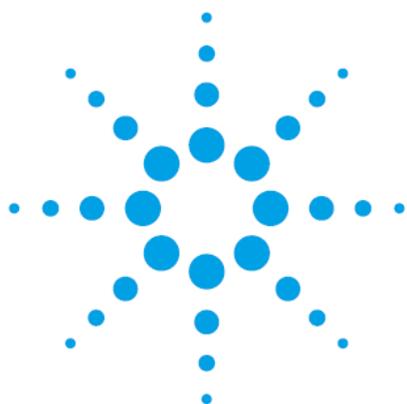
Option 2: その他のプラットフォームを用いた解析(マニュアル)

マニュアルでのサンプル調製を行い、Agilent 2100 バイオアナライザ、Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer、Agilent 4200/4150 TapeStation を用いて解析を行うことができます。

得られるエレクトロフェログラムは 4200 TapeStation の同様なフラグメントサイズプロファイルになることが期待されます。泳動終了後、エレクトロフェログラムで期待される DNA フラグメントサイズのピークが得られているか確認します。分析オプションについて表 55 を参照ください。

表 55 キャプチャ前ライブラリの分析オプション

Analysis platform	Assay used at this step	Link to assay instructions	Amount of library sample to analyze
Agilent 4200/4150 TapeStation system	D1000 ScreenTape	Agilent D1000 Assay Quick Guide	1 μ L of sample mixed with 3 μ L of D1000 sample buffer
Agilent 2100 BioAnalyzer system	DNA 1000 Kit	Agilent DNA 1000 Kit Guide	1 μ L of sample
Agilent 5200, 5300, or 5400 Fragment Analyzer system	NGS Fragment Kit (1-6000 bp)	Agilent NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Guide	2 μ L of sample



5 ハイブリダイゼーション

Step 1, Option 1. Single-Prex ハイブリダイゼーション用 DNA の調製	78
Step 1, Option 2. マルチプレックスハイブリダイゼーション用の DNA の調製.....	81
Step 2. DNA ライブラリとキャプチャプローブのハイブリダイゼーション	92
Step 3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャ	101

この章では SureSelect または ClearSeq キャプチャライブラリを用いたハイブリダイゼーションとキャプチャの工程が記されています。

最初のステップでハイブリダイゼーション用のサンプルを準備します。サンプルをプールするタイミングによってことなるオプションを使用します。

- ・ハイブリダイゼーション後にサンプルをプールする場合
- ・ハイブリダイゼーション前にサンプルをプールする場合

CAUTION

キャプチャライブラリと調製した DNA ライブラリの比率は、高いキャプチャ効率を得るために極めて重要です。プロトコルに記載されている量に従い、ハイブリダイゼーションを行ってください。

Step 1, Option 1. Single-Prexハイブリダイゼーション用DNAの調製

ポストキャプチャプーリングワークフローの場合に行います。プレキャプチャプーリングワークフローの場合には Step 1, Option 2. マルチプレックスハイブリダイゼーション用の DNA の調製を参照ください。

DNAサンプルの分注

調製したそれぞれの DNA サンプルに対して、ハイブリダイゼーションとキャプチャを行います。ハイブリダイゼーション反応には 500~1000 ng の DNA が必要です(液量 12 μ L)。この範囲でなるべく多くの量をハイブリダイゼーションに用いてください。

71~76 ページで計算したサンプルの濃度を用いて、ハイブリダイゼーションに使用する液量を以下の式で計算します。

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 1000 \text{ ng}/\text{concentration } (\text{ng}/\mu\text{L})$$

推奨の 1000 ng に満たないサンプルがあった場合、残りの DNA サンプルを全量(約 10~12 μ L、少なくとも 500 ng を含むこと)をハイブリダイゼーションのステップで使用してください。

自動化プロトコル Aliquote_Libraries を実行し、ハイブリダイゼーションに使用する各 DNA サンプルの適切な量を新しいプレートに分取することができます。自動化プロトコルを実行する前に、各サンプルの分取する液量を自動化システムに指示するための表を以下のステップに従い作成する必要があります。

1. 図 11 に示すヘッダーをつけた.csv (comma separated value) ファイルを作成します。ヘッダーの文字はスペースを含まないようにしてください。この表は Microsoft の Excel などのスプレッドシート作成アプリケーションを使って作成し、保存する際に.csv フォーマットにすることもできます。このファイルはプレートの全 96 ウェル分の行(rows)を含む必要があります。
2. 各 DNA サンプルについてヘッダーの項目に関する情報を入力します。
 - ・ SourceBC の列にはサンプルプレートの内容、またはバーコードを入力します。SourceBC の列は、全ての row で同じになります。
 - ・ SourceWell と DestinationWell の列には、プレートでのそれぞれのウェルの位置を入力します。SourceWell と DestinationWell に書かれた内容は各サンプルについて同じになります。

Volume の列には、それぞれのサンプルのハイブリダイゼーションに使用する液量(μ L)を入力します。使用しないウェルの行は削除します。

	A	B	C	D
1	SourceBC	SourceWell	DestinationWell	Volume
2	abc	A1	A1	5.35
3	abc	B1	B1	4.28
4	abc	C1	C1	5.19
5	abc	D1	D1	4.76
6	abc	E1	E1	5.19
7	abc	F1	F1	5.49
8	abc	G1	G1	4.86
9	abc	H1	H1	5.05
10	abc	A2	A2	4.37

図 11 1 カラムラン用サンプルスプレッドシート

NOTE

サンプルスプレッドシートは以下のフォルダに保存されています。

C:\¥VWorks Workspace¥NGS

Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Aliquot Input File Templates¥

Aliquot_Libraries_Template.csv (x.x.x はバージョン番号)

Aliquot_Libraries_template.csv ファイルをコピーし、

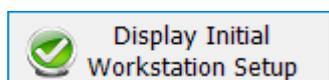
各 Aliquot_Libraries_v.B1.0.1pro のランの csv ファイルを作成するためのテンプレートとして使用できます。12 カラム (96 サンプル) より少ないランのテンプレートとして使用する場合、96 ウェル分の行があること、使用しないウェルの行は削除されていることを確認してください。

- VWorks ソフトウェアがインストールされている PC の以下のフォルダに .csv ファイルをロードします。
C:\¥VWorks Workspace¥NGS Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Aliquot Input File Templates
- チラーの電源を入れ、0°C に設定します。Bravo デッキの 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
- 表 56 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 56 Aliquot_Libraries 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
2	Nuclease-free water in Agilent shallow well reservoir (30 mL)
5	Empty Eppendorf twin.tec plate
6	Empty tip box
8	New tip box
9	Prepped library DNA in Eppendorf twin.tec plate

- セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM を選択します。
- Display Initial Workstation Setup をクリックします。

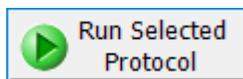


5 ハイブリダイゼーション

8. 78 ページのステップ 1~3 で準備した csv ファイルをアップロードします。
 - a. Form 画面の「Select Aliquot input file」の“...”をクリックします。



- b. csv ファイルの保存場所を開き、ファイルを選択して Open をクリックします。Window が閉じたら、Select Aliquot Input File に選択したファイルが表示されているか確認します。
9. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
10. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
11. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



Aliquot_Libraries の実行には 96 サンプルで約 1 時間かかります。DNA サンプルプレートは Bravo デッキ 5 番のプレートに入った状態になります。

12. Bravo デッキからサンプルプレートを取り出します。

Step 1, Option 2. マルチプレックスハイブリダイゼーション用のDNAの調製

プレキャプチャプーリングワークフローの場合に行います。ポストキャプチャプーリングワークフローの場合には Step 1, Option 1. Single-Prex ハイブリダイゼーション用 DNA の調製を参照ください。

インデックス付加DNAサンプルのプール

このステップでは自動化プロトコルを用いてハイブリダイゼーション前のサンプルのプールを行います。このワークフローでは以下の画面の XT_HS2_Pooling のフォームを使用します。

The screenshot shows the software interface for the SureSelect XT HS2 DNA Pooling and Normalization process. The interface is organized into several functional areas:

- Agilent Trusted Answers:** The top left corner features the Agilent logo and the text "Trusted Answers".
- Pooling Options:** This section includes:
 - Number of Indexes to Pool (8 or 16): 8
 - Pooled DNA Quantity (ng) (2 Hyb): 3000
- Destination Plate ID/Barcode:** A field for "Destination1" is provided.
- Source Plates:**
 - Number of Source Plates: 1
 - Load Sources: To MiniHub Manually
 - Sources Enter Sealed?: Yes No
 - A table with 8 rows (Plate 1-8) and 3 columns (Concentration File, ID/Barcode). The ID/Barcode column contains Source1 through Source8.
- Controls:**
 - Buttons for Display Setup, Run Protocol, and Pause.
 - Buttons for Initialize all devices and Full Screen.
 - Buttons for XT HS2 DNA.
 - A Gantt Chart and a field for Elapsed Time (00:00:00).
- Currently Processing Input File:** A field at the bottom left for the input file name.
- Workstation Layout:** On the right, a diagram shows the "Bravo Deck" with 9 positions (1-9) and the "BenchCel 4R" with 4 Stacker and 4 Cassette positions. Below this is a grid for MiniHub, Cassette 1-4, and Shelf 1-5.

5 ハイブリダイゼーション

パラメータの設定

ハイブリダイゼーションには 1500 ng のインデックス付加 gDNA (SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8 Probe の場合には 3000 ng) を使用します。8 または 16 サンプルが等量含まれるようにします。ハイブリダイゼーションに使用する各キャプチャライブラリの推奨 gDNA プール内容は表 57 を参照してください。

表 57 プレキャプチャプールの推奨

Probe	Amount of total DNA per pool (Amount of DNA pool per hybridization reaction)*	Number of indexed gDNA libraries per pool	Amount of each indexed gDNA library in pool	Maximum DNA concentration for pool
SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8	6000 ng (3000 ng/hybridization)	8	750 ng	375 ng/ μ L
SureSelect Custom Probe	3000 ng (1500 ng/hybridization)	16	187.5 ng	93.75 ng/ μ L
ClearSeq Comprehensive Cancer	3000 ng (1500 ng/hybridization)	16	187.5 ng	93.75 ng/ μ L
SureSelect Human or Mouse All-Exon	3000 ng (1500 ng/hybridization)	8	375 ng	187.5 ng/ μ L
SureSelect Clinical Research Exome	3000 ng (1500 ng/hybridization)	8	375 ng	187.5 ng/ μ L
SureSelect Focused Exome	3000 ng (1500 ng/hybridization)	8	375 ng	187.5 ng/ μ L
ClearSeq Inherited Disease	3000 ng (1500 ng/hybridization)	8	375 ng	187.5 ng/ μ L

可能な限りハイブリダイゼーション 2 回分のインデックス DNA プールを準備するようにします。

例: SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8 の場合 6000 ng、その他のプローブの場合 3000 ng

DNA プールによっては、最初のライブラリに 2 回以上のハイブリダイゼーション反応に十分な DNA が含まれることが見込まれます。

プーリングのセットアップを行う前にプールする DNA 量と DNA サンプル濃度に応じて液量を決定する必要があります。

正確な分取には少なくとも 2 μ L のサンプルを分取する必要があります。表 57 の DNA 濃度の上限は、2 μ L のサンプルが分取できるように設定されています。推奨よりも DNA 濃度が高い場合には、以下の方法で調製してください。

- ・正確な量の DNA をプールするため、ソースプレートの各サンプルの DNA 濃度を確認します。
 - ・全てのサンプルが表 57 で推奨されている濃度を下回る場合、合計で 3000 ng (SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8 の場合は 6000 ng) の DNA がプールできるように準備します。
 - ・一つでもサンプルが推奨の濃度を超える場合は、適切な DNA プール量を計算する必要があります。まず、最も濃度が高いサンプルについて、2 μ L でどのくらいの DNA 量が含まれるか計算します。これが各サンプルの DNA 量となります。
例: 最も濃度が高いサンプルが 200 ng/ μ L の場合、各サンプルが 400 ng ずつプールされるようにサンプルをプールし、DNA の総量を決定します。Focused Exome DNA キャプチャライブラリの場合には 8x 400 ng で 3200 ng の DNA をプールします。

プール先のサンプルプレートの設定

インデックス付加 gDNA サンプルはデスティネーションプレートにプールされます。

gDNA サンプルをプールしてハイブリダイゼーションとキャプチャを行う際の考慮事項を説明します。

- ・プレートに対して単一のキャプチャライブラリを使用する場合、A1~H1、A2~H2...、A12~H12 の順に使用します。
- ・複数種類のキャプチャライブラリを使用する場合、それぞれの行にことなるキャプチャライブラリをハイブリダイズするように決定します。Hyb_XT_HS2_ILM のプロトコルの準備の際に、同じキャプチャライ

ラリは同じ列でハイブリダイズするようにします。

・96 反応ライブラリを作成した場合、最終的に 6 または 12 の gDNA プールが作製されます。試薬の効率化のために、gDNA プールを同じデスティネーションプレートに作成することができます。

サンプルプール用 csv ファイルの作成

自動化プロトコルによるサンプルのプールを行う前に、サンプルの分取を自動化システムに指示するための表を以下のステップに従い作成する必要があります。この表を基に自動化システムは各サンプルの液量を計算し、ハイブリダイゼーションに進むための濃度のノーマライズを行います。表の内容については図 12 を参照ください。ファイルテンプレートは以下に保存されています。

C:\¥VWorks Workspace¥NGS Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Pooling and NormalizationTemplates

プールするサンプル数(8 または 16 サンプル)とソースプレートの順番に応じて正しいテンプレートを使用してください。1 枚目のソースプレートから 8 サンプルをプールする場合、Pool8_01_SourcePlate.csv を使用し 2 枚目以降のソースプレートを使用する際には Pool8_0X_SourcePlate.csv を使用します。

1. 使用する.csv ファイルテンプレートをコピーします。ヘッダーにはスペースやその他の文字を含まないようにしてください。サンプルが含まれていない Well の行は削除します。

	A	B	C
1	Well ID	PreCap Amplified pond concentrations (ng/ul)	Target WellID
2	A1	52.79	A1
3	B1	49.21	A1
4	C1	38.73	A1
5	D1	43.56	A1
6	E1	39.7	A1
7	F1	45.33	A1
8	G1	53.38	A1
9	H1	48.91	A1
10	A2	40.74	B1
11	B2	37.22	B1
12	C2	42.03	B1

図 12 サンプルのプールとノーマライズ用 .csv file の構成

2. csv ファイルのサンプル情報を編集します。
 - ・ PreCap Amplified pond concentrations には 71 ページで決定した各サンプルの DNA 濃度を入力します。
 - ・ Target WellID にはプール先(デスティネーションプレート)の WellID を記入します。

CAUTION

この工程では各プレートで 48 以下あるいは 96 サンプル全てを処理するようにしてください。システムの故障につながるおそれがあるため、サンプル数が 49~95 の場合には Well の行を削除せずに以下のように変更してください。

Well ID: 空いている Well(同じ Well を繰り返し入力可能です。)

PreCap Amplified pond concentrations: 0

Target WellID: 使用しない Well(デスティネーションプレート)

指定した Well にサンプルが含まれている場合、サンプルの吸引は行われませんが、チップの先端がサンプルに触れます点ご了承ください。

5 ハイブリダイゼーション

PreCapture_Pooling 自動化ランの準備と実行

3. チラーの電源を入れ、0°Cにセットします。Bravo デッキ 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
4. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
5. PreCapture_Pooling 自動化ランの実行のために以下のいずれかの方法で XT2_HS2_Pooling フォームを開きます。
 - ・ デスクトップ上の the XT2_HS2_Pooling VWorks Form のショートカットをダブルクリック
 - ・ C:\%VWorks Workspace\NGS Option B\XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x\Forms (x.x.x はバージョン番号)にある XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x.VWForm を開く
 - ・ XT_HS2_ILM VWorks フォームから Reference 内の Pooling Form をクリック
6. XT_HS2_Pooling Form に以下の情報を入力します。
 - ・ Pooling Options の Number of Indexes to Pool より、Pool するサンプル数を 8 または 16 から選択します。
 - ・ Pooling Options の Pooled DNA Quantity に、プールする DNA の総量を入力します。

SureSelect XT HS Human All Exon V8 キャプチャライブラリの場合は 6000 ng 必要とします。その他のキャプチャライブラリの場合は 3000 ng です。この総量はハイブリダイゼーション反応を 2 回行うために十分な量が含まれています。
 - ・ Destination Plate ID/Barcode よりデスティネーションプレートの名前またはバーコードを入力します。
 - ・ Source Plate の Number of Source Plate から、インデックス付加 DNA サンプルが入ったソースプレートの枚数を選択します。
 - ・ Source Plate よりソースプレートをマニュアルでロードするか、MiniHub にセットするか、ソースプレートがシールされているかどうかをオプションで選択します。
 - ・ Source Plate の Concentration File から、各ソースプレートの情報が入った.csv ファイルを指定します。

Pooling Options

Number of Indexes to Pool (8 or 16):

Pooled DNA Quantity [ng] (2 Hyb):
 3000ng or 6000ng (All Exon V8)

Destination Plate ID/Barcode

Source Plates

Number of Source Plates:

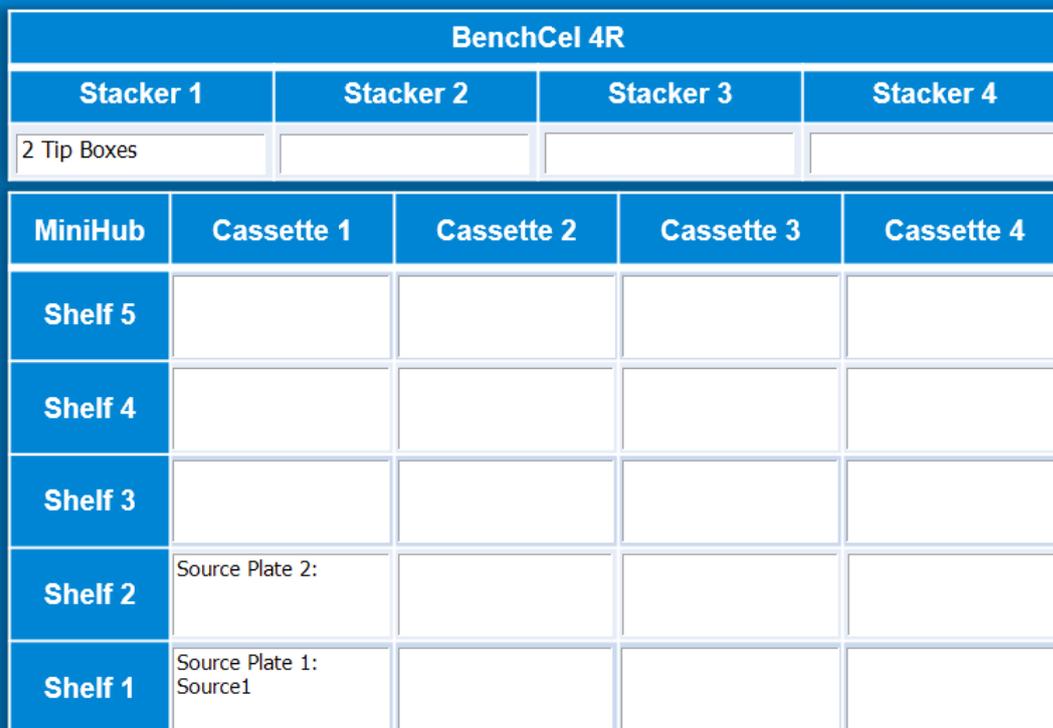
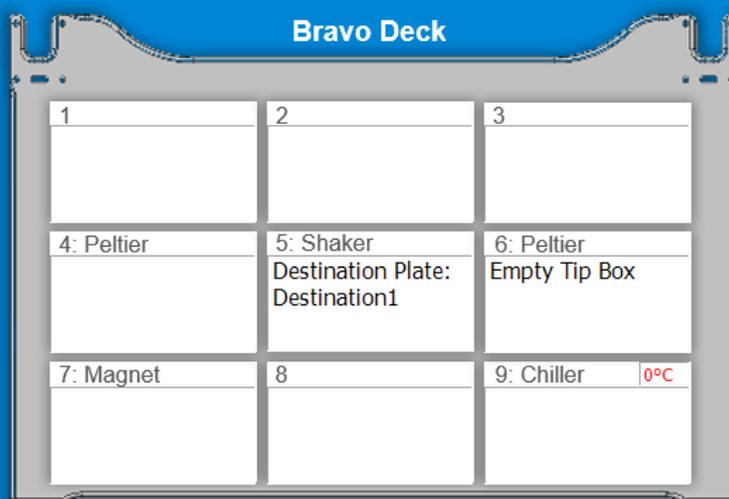
Load Sources To MiniHub Manually

Sources Enter Sealed? Yes No

Plate	Concentration File	ID/Barcode
1	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source1
2	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source2
3	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source3
4	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source4
5	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source5
6	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source6
7	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source7
8	<input style="width: 90%;" type="text"/> ...	Source8

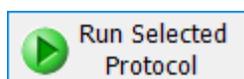
7. パラメータの入力が完了したら Display Setup をクリックします。
8. フォームの Workstation Setup 領域の表示に従い、プレート等をセットします。

NGS Workstation B Setup



2 枚のインデックス付加 DNA ライブラリが入ったソースプレートからプールする場合の設定

- ・DNA ソースプレートを MiniHub にセットします。
 - ・Eppendorf twin.tec デスティネーションプレートを Bravo デッキの 5 番にセットします。
 - ・空のチップボックスを Bravo デッキの 6 番にセットします。
 - ・BenchCel Stacker 1 に指示された個数のチップボックスをセットします。
9. 正しくセットアップされているか、ダブルチェックを行い、Run protocol をクリックします。



CAUTION

インデックス付加 DNA サンプルが含まれたソースプレートを 2 枚以上使用してサンプルをプールする場合、作業者はプロトコル実行中にプレートシールをはがすために装置の近くにいる必要があります。

PreCapture_Pooling の実行には DNA ソースプレート 1 枚当たり約 1 時間かかります。

完了すると、サンプルがプールされたデスティネーションプレートが Bravo デッキ 5 番に入った状態になります。

10. デスティネーションプレートを Bravo デッキ 5 番から取り出します。
11. インデックス付加 DNA サンプルプレートは、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールし、氷上に置きます。

プールしたDNAの終濃度の調整

ハイブリダイゼーション反応前に自動化プロトコル Aliquot_Water と AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) を用いてライブラリプールを 24 μ L に濃縮します。この液量はハイブリダイゼーション反応 2 回分に相当します。はじめに、Aliquot_Water プロトコルを使って、ライブラリプールの液量を 100 μ L にします。そして AMPureXP_XT_HS2_ILM プロトコルにより、AMPure beads を用いた精製を行い、24 μ L で溶出します。

このステップでは 40 ページで調製した AMPure XP ビーズプレートを使用します。

プール後サンプルの液量の調整

- 図 13 のヘッダーを参照に.csv (comma separated value) ファイルを作成します。ヘッダーの文字はスペースを含まないようにしてください。この表は Microsoft の Excel などのスプレッドシート作成アプリケーションを使って作成し、保存する際に.csv フォーマットにすることもできます。このファイルはプレートの全 96 ウェル分の行 (rows) を含む必要があります。
- 各 DNA サンプルについてヘッダーの項目に関する情報を入力します。
 - SourceBC の列にはサンプルプレートの内容、またはバーコードを入力します。SourceBC の列は、全ての row で同じになります。
 - SourceWell と DestinationWell の列には、プレートでのそれぞれのウェルの位置を入力します。SourceWell と DestinationWell に書かれた内容は各サンプルについて同じになります。
 - Volume の列には、それぞれのサンプルのハイブリダイゼーションに使用する液量 (μ L) を入力します。使用しないウェルの行は削除します。

	A	B	C	D
1	SourceBC	SourceWell	DestinationWell	Volume
2	abc	A1	A1	5.5
3	abc	B1	B1	5.2
4	abc	C1	C1	11
5	abc	D1	D1	5.9
6	abc	E1	E1	17.5
7	abc	F1	F1	5.5
8	abc	G1	G1	23
9	abc	H1	H1	5.6
10	abc	A2	A2	5.4

図 13 Aliquot_Water 用.csv ファイルの構成

NOTE

サンプルスプレッドシートは以下のフォルダに保存されています。

C:\%VWorks Workspace\%NGS Option B\XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x\Aliquot Input File Templates (x.x.x はバージョン番号) Aliquot_Water_Template.csv ファイルをコピーし、各 Aliquot_Water ランの csv ファイルを作成するためのテンプレートとして使用できます。12 カラム (96 サンプル) より少ないランのテンプレートとして使用する場合、使用しない Well の情報は削除してください。

- VWorks ソフトウェアがインストールされている PC の以下のフォルダに.csv ファイルをロードします。
C:\%VWorks Workspace\%NGS Option B\XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x\Aliquot Input File Templates

Aliquot_Water 自動化プロトコルのセットアップと実行

4. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
5. 30 mL の Nnlease free water の入った Agilent shallow well reservoir を準備します。

リザーバー内の nuclease-free water に気泡がないことを確認します。ある場合はピペットチップ等で取り除きます。

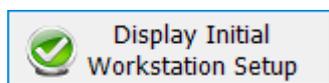
このリザーバーは 1 日以内の使用に限り、以降の SSELCapture&Wash_XT_HS2 runset と Post-CapPCR_XT_HS2_ILM、AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) プロトコルで再利用できます。

6. 表 58 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 58 Aliquot_Water 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
5	Pooled library DNA in Eppendorf twin.tec plate
6	Empty tip box
8	New tip box
9	Nuclease-free water reservoir from step 2

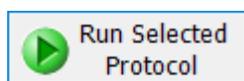
7. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Aliquot_Water を選択します。
8. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



9. 88 ページのステップ 1~3 で準備した csv ファイルをアップロードします。
 - a. Form 画面の「Select Aliquot input file」の“...”をクリックします。



- b. csv ファイルの保存場所を開き、ファイルを選択して Open をクリックします。Window が閉じたら、Select Aliquot Input File に選択したファイルが表示されているか確認します。
10. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
11. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
12. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



5 ハイブリダイゼーション

Aliquot_Water プロトコルの実行には 96 サンプルプールで約 1 時間かかります。DNA サンプルプレートは Bravo デッキ 5 番のプレートに入った状態になります。

13. Bravo デッキ 5 番からサンプルプレートを取り出します。
14. サンプルプレートは、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールし、氷上に置きます。

AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) のセットアップと実行

15. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
16. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
17. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 45°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
18. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキ 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
19. 30 mL の Nuclease free water の入った Agilent shallow well reservoir を準備します。リザーバー内の nuclease-free water に気泡がないことを確認します。ある場合はピペットチップ等で取り除きます。
20. 50 mL の 70% エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。
21. 表 59 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

表 59 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Aliquoted AMPure XP beads in Agilent deep well plate from page 40 (180 µL of beads/well)	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty Eppendorf twin.tec Plate	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 18	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 19	—	Empty tip box

22. 表 60 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 60 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
9	Eppendorf twin.tec plate containing DNA library pools from the Aliquot_Water protocol seated in red insert

23. 表 61 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

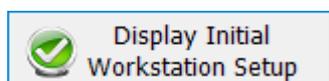
表 61 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool) 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

24. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から LibraryPrep_XT_HS2_ILM を選択します。

25. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択します。

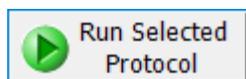
26. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



27. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。

28. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

29. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



精製プロトコルの実行には約 45 分かかります。完了すると精製された DNA サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

Step 2. DNAライブラリとキャプチャプローブのハイブリダイゼーション

このステップでは自動化プロトコル Hyb_XT_HS2_ILM を使用して、ハイブリダイゼーション反応のセットアップを行います。その後、サーマルサイクラにサンプルプレートを移動し、65°Cで保温して SureSelect または ClearSeq キャプチャライブラリへの DNA サンプルのハイブリダイゼーションを行います。

このステップでは表 62 に示す試薬を使用します。使用前に表の指示に従い各試薬を溶解し、ボルテックスマキサーで混合、スピンドアウンをして液を集めてください。

表 62 ハイブリダイゼーションで使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Where Used
SureSelect XT HS2 Blocker Mix (blue cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	94 ページ
SureSelect RNase Block (purple cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	96 ページ
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw and keep at Room Temperature	96 ページ
Probe	-80°C	Thaw on ice	96 ページ

サーマルサイクラの準備

1. SureSelect XT HS Human All Exon V8 Probe (V8、V8+UTR または V8+NCV) を使用する場合は表 63、それ以外のキャプチャプローブは全て表 64 に従いサーマルサイクラのプログラムを設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

必要なサンプルと試薬の温度を維持するために、ハイブリダイゼーションの自動化プログラムを始める前にサーマルサイクラのプログラムを事前に設定しておくことが重要です。

表 63 SureSelect XT HS Human All Exon V8 Probe (V8、V8+UTR または V8+NCV) 使用時のハイブリダイゼーションプログラム*

Segment	Purpose	Number of Cycles	Temperature	Time
1	Denaturation	1	95°C	5 minutes
2	Blocking	1	65°C	10 minutes
3	Hold for NGS workstation steps [†]	1	65°C	Hold
4	Hybridization	60	65°C	1 minute
			37°C	3 seconds
5	Hybridization	1	65°C	60 minutes
6	Hold until start of Capture [‡]	1	65°C [†]	Hold

* 反応量は 35 µL に設定してください (Segment4 のサイクルでの最終反応液量)。

† VWorks ソフトウェアで指示が表示された後、サンプルを Hold ステップの間にワークステーションに移します。

*103 ページで始まるキャプチャと洗浄自動化プロトコルまでサンプルは 65°C で維持します。

表 64 他のプローブを使用する場合のハイブリダイゼーションのサーマルプログラム*

Segment	Purpose	Number of Cycles	Temperature	Time
1	Denaturation	1	95°C	5 minutes
2	Blocking	1	65°C	10 minutes
3	Hold for NGS workstation steps [†]	1	65°C	Hold
4	Hybridization	60	65°C [‡]	1 minute
			37°C	3 seconds
5	Hold until start of Capture ^{**}	1	65°C [†]	Hold

* 反応量は 35 µL に設定してください (Segment4 のサイクルでの最終反応液量)。

[†] VWorks ソフトウェアで指示が表示された後、サンプルを Hold ステップの間にワークステーションに移します。

[‡] SureSelect XT HS2/XT HS/ XT Low Input プラットフォームに設計されたプローブは 65°C でのハイブリダイゼーションが最適です。ハイブリダイゼーションの温度 (Segment 4 と 5) を SureSelect XT2 Human All Exon V6 や SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 など SureSelect XT2 プラットフォームは 62.5°C、SureSelect XT2 システム用に設計されたカスタムプローブは 60~65°C に下げることでパフォーマンスが向上する可能性があります。

** 103 ページで始まるキャプチャと洗浄自動化プロトコルまでサンプルは 65°C で維持します。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度は高く、やけどをする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください

NOTE

ハイブリダイゼーションをオーバーナイトで行う場合は次のようにプロトコルを変更します。

- ・サーマルプログラム (表 63 または表 64) の最終セグメントを 65°C Hold から 21°C Hold にします。
- ・ステップ 1 に記載されているようにサーマルサイクラを Pause し、再開する前に 92 ページから 97 ページに記載されているハイブリダイゼーションのセットアップを完了してください。
- ・ハイブリダイズしたサンプルは 21°C で 16 時間までおくことができます。

ワークステーションの準備

2. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
3. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
4. チラーの電源を入れ、0°C に設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
5. 赤いアルミニウムインサートを Bravo デッキ 4 番と 6 番に置きます。
6. 空のチップボックスを MiniHub shelf1 のカセット 4 にセットします。

5 ハイブリダイゼーション

7. 表 65 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 65 Hyb_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	2 Tip boxes	—	—	—
2	2 Tip boxes	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	2 Tip boxes	—	—	—
12	3 Tip boxes	—	—	—

Block マスターミックスの調製

8. 表 66 に従い、適切な Block マスターミックスを氷上で調製します。

表 66 Block マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µL	31.9 µL	53.1 µL	74.4 µL	95.6 µL	138.1 µL	276.3 µL
SureSelect XT HS2 Blocker Mix (blue cap)	5.0 µL	63.8 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	276.3 µL	552.5 µL
Total Volume	7.5 µL	95.7 µL	159.4 µL	223.2 µL	286.9 µL	414.4 µL	828.8 µL

プローブハイブリダイゼーションマスターミックスの調製

表 67 に従い、ハイブリダイゼーションに使用する各キャプチャライブラリにおいて適切な量を調製します。高速のボルテックスミキサーで完全に混合し、スピンドウンをして氷上に置いておきます。

NOTE

調製した DNA サンプルプレートのそれぞれの Row (行) に異なるキャプチャライブラリをハイブリダイズすることができます。しかし、キャプチャライブラリのサイズが異なるとキャプチャ後増幅でのサイクル数が異なります。同じプレートには同じ PCR サイクル数となるターゲットサイズのライブラリをハイブリダイズさせるように実験計画を立ててください。

プレートの全ての Row で 1 種類のキャプチャライブラリを使用するランの場合、94 ページの step a (表 67 または表 68) に従ってマスターミックスを調製してください。

個々の Row で異なるキャプチャライブラリを使用するランの場合、95 ページの step b (表 69 または表 70) に従ってマスターミックスを調製してください。

- 全ての row で 1 つのキャプチャライブラリを使用するランの場合、キャプチャライブラリのサイズに応じて表 67 または表 68 に従って Capture Library マスターミックスを調製してください。

表 67 ターゲットサイズ 3 Mb 未満のキャプチャライブラリの場合の Probe Hybridization Mix の調製

Target size <3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	7.0 µL	89.3 µL	148.8 µL	208.3 µL	267.8 µL	401.6 µL	818.1 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	6.4 µL	10.6 µL	14.9 µL	19.1 µL	28.7 µL	58.4 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	76.5 µL	127.5 µL	178.5 µL	229.5 µL	344.3 µL	701.3 µL
Probe (with design <3.0 Mb)	2.0 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	114.8 µL	233.8 µL
Total Volume	15.5 µL	197.7 µL	329.4 µL	461.2 µL	592.9 µL	889.4 µL	1811.6 µL

表 68 ターゲットサイズ 3 Mb 以上のキャプチャライブラリの場合の Probe Hybridization Mix の調製

Target size ≥3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	4.0 µL	51.0 µL	85.0 µL	119.0 µL	153.0 µL	229.5 µL	467.5 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	6.4 µL	10.6 µL	14.9 µL	19.1 µL	28.7 µL	58.4 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6 µL	76.5 µL	127.5 µL	178.5 µL	229.5 µL	344.3 µL	701.3 µL
Probe (with design ≥3.0 Mb)	5.0 µL	63.8 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	286.9 µL	584.4 µL
Total Volume	15.5 µL	197.7 µL	329.4 µL	461.2 µL	592.9 µL	889.4 µL	1811.6 µL

- b. 個々の row で異なるキャプチャライブラリを使用するランの場合、キャプチャライブラリのサイズに応じて表 69 または表 70 に従って Capture Library マスターミックスを調製してください。表 69 と表 70 に示す液量はサンプルウェル 1row 分です。複数の row で同じキャプチャライブラリをハイブリダイズする場合は、下表に示す量に使用する予定の row 数をかけてください。ピペット操作のロス分も考慮してください。

表 69 ターゲットサイズ 3 Mb 未満のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分

Target size <3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	7 µL	10.5 µL	17.5 µL	24.5 µL	31.5 µL	49.0 µL	98.0 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	0.8 µL	1.3 µL	1.8 µL	2.3 µL	3.5 µL	7.0 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	9.0 µL	15.0 µL	21.0 µL	27.0 µL	42.0 µL	84.0 µL
Probe (with design <3 Mb)	2.0 µL	3.0 µL	5.0 µL	7.0 µL	9.0 µL	14.0 µL	28.0 µL
Total Volume	15.5 µL	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL

5 ハイブリダイゼーション

表 70 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分

Target size ≥3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	4.0 µL	6.0 µL	10.0 µL	14.0 µL	18.0 µL	28.0 µL	56.0 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	0.8 µL	1.3 µL	1.8 µL	2.3 µL	3.5 µL	7.0 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	9.0 µL	15.0 µL	21.0 µL	27.0 µL	42.0 µL	84.0 µL
Probe (with design ≥3 Mb)	5.0 µL	7.5 µL	12.5 µL	17.5 µL	22.5 µL	35.0 µL	70.0 µL
Total Volume	15.5 µL	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL

マスターミックスのソースプレートの調製

9. Step 8 と 9 で調製したマスターミックスを **Eppendorf twin.tec プレート** にいれハイブリダイゼーションマスターミックスソースプレートを **室温** で調製します。表 71 に従い、各マスターミックスを指定された Eppendorf twin.tec プレートのカラムの各ウェルに加えます。1 回のランで複数のキャプチャライブラリを使用する場合は、Capture Library マスターミックスを Eppendorf twin.tec プレートの適切な row に加えてください。マスターミックスソースプレートは最終的な配置を図 14 に示します。

表 71 Hyb_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Block master mix	Column 1 (A1-H1)	11.0 µL	19.0 µL	27.0 µL	34.9 µL	50.9 µL	102.7 µL
Probe Hybridization master mix	Column 2 (A2-H2)	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL*

*217.0 µL の液量を含む場合、Well がほぼ一杯となるため、気泡が入らないように気を付けてピペティングし、液がこぼれないよう慎重に扱ってください。遠心操作を行わないでください。

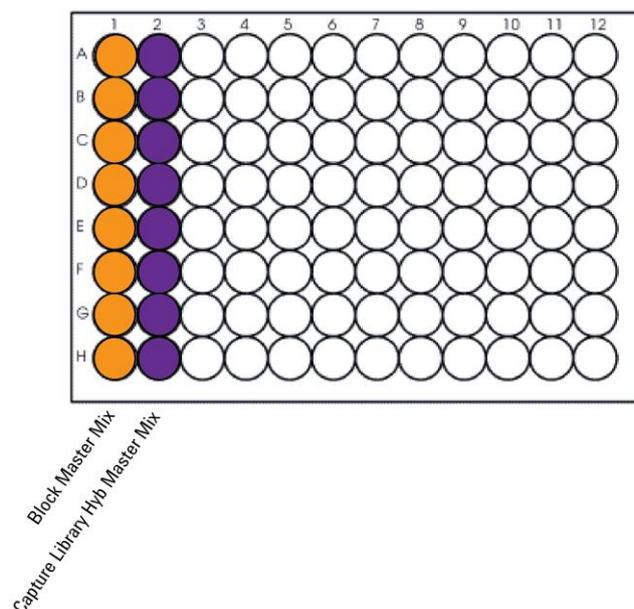


図 14 Eppendorf twin.tec master mix source plate の配置

Column2 には各 row に異なるキャプチャライブラリを入れることができます。

10. Bravo デッキのセットアップにすぐに進み、マスターミックスプレートを室温に置く時間をできるだけ短くするようにします。

Bravo デッキのセットアップ

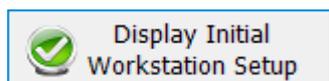
11. 表 72 に従って Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 72 Hyb_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

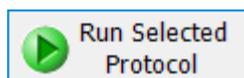
Location	Content
4	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
5	Empty Eppendorf twin.tec plate
6	Eppendorf twin.tec Master Mix source plate (unsealed) seated in red insert
8	Empty tip box
9	Prepared library aliquots or library pools in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)

Hyb_XT_HS2_ILM の実行

12. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から **Hyb_XT_HS2_ILM** を選択します。
13. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択します。
14. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
15. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



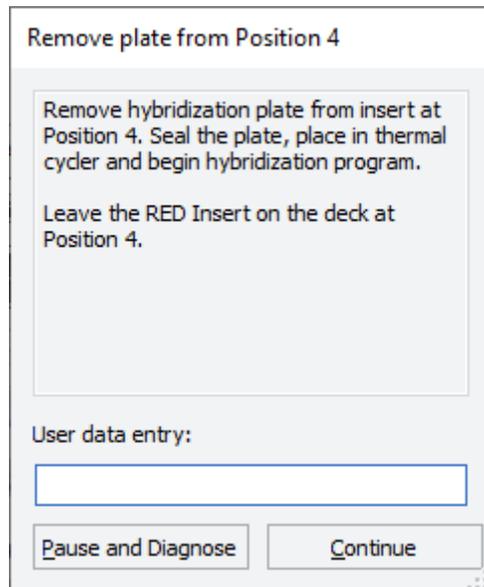
16. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
17. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
18. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



自動化システムは調製した DNA ライブラリと分注した Block マスターミックスを混合します。作業が完了すると、ハイブリダイゼーション前のサンプルの熱変性とブロッキングのためにプレートをサーマルサイクルに移すようメッセージが表示されます。

5 ハイブリダイゼーション

19. VWorks で以下に示すメッセージが表示されたら、PCR プレート Bravo デッキ 4 番から赤いアルミニウムインサートは残したままで取り出します。サンプルプレートを取り出した後、Continue をクリックしてください。



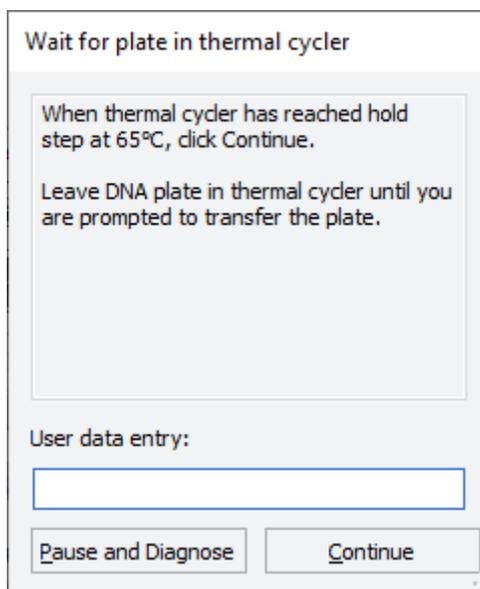
20. サンプルプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
21. シールしたプレートをサーマルサイクラに移し、92 ページの表 63 または 93 ページの表 64 で示した反応を開始します。

サーマルサイクラでサンプルをインキュベートしている間、自動化プログラムは Capture Library マスターミックスと Hybridization Buffer マスターミックスを混合します。

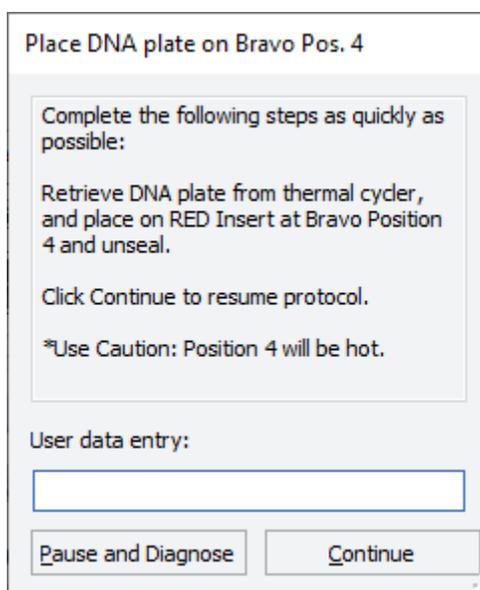
CAUTION

以下の step 22 から step 26 は迅速に、VWorks ソフトウェアの指示が表示されたらすぐに実施しなければなりません。自動化システムのそばを離れないようにしてください。自動化システムとサーマルサイクラの間で移動をする際、サンプルの温度が 65°C に保たれることが非常に重要です。

22. ワークステーションが Capture Library と Hybridization Buffer マスターミックスの分取が完了すると VWorks に以下の指示が表示されます。サーマルサイクラが 65°C、Hold のステップになっていることを確認し(まだ Hold になっていなかったら、Hold になるまで待ってから)Continue をクリックします。プレートをかすように指示があるまでは、サーマルサイクラにサンプルプレートを入れておいてください。



23. VWorks に以下の指示が表示されたら、迅速にサンプルプレートをサーマルサイクルから取り出し、Bravo デッキ 4 番の赤いアルミニウムインサートの上に載せてください。溶液が飛び散らないようにシールを剥がし、Continue をクリックします。

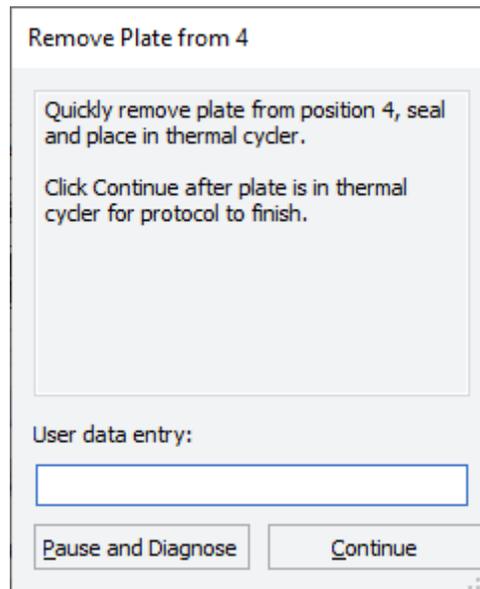
**WARNING**

Bravo デッキ 4 番は高温です。
高温のデッキに接触しているものを扱う際には注意してください。

自動化システムは DNA サンプルとブロッキング試薬の混合液を含む PCR プレートのウェルに、キャプチャライブラリとハイブリダイゼーションバッファの混合液を移します。

5 ハイブリダイゼーション

24. VWorks に以下の指示が表示されたら、迅速に Bravo デッキ4番から PCR サンプルプレート（赤いアルミニウムインサートは残したまま）を取り出します。



25. サンプルプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
26. すぐにプレートをサーマルサイクラに戻し、65°Cで保温します。Play ボタンを押し、設定したプログラムのハイブリダイゼーション（94 ページ、表 63 または表 64 の segment4）を開始します。このステップで、調製した DNA サンプルはキャプチャライブラリにハイブリダイズします。

CAUTION サーマルサイクラのプレートの温度は 105°Cの加温式の蓋 (heat lid)を用いて 65°Cで使用します。サーマルサイクラの蓋の温度は高く、やけどする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

27. サーマルサイクラでハイブリダイゼーションを開始したら、VWorks スクリーンの Continue をクリックします。
28. VWorks プロトコルを終了させるため、Unused Tips と Empty Tip box ダイアログボックスの Continue をクリックし、その後 Protocol Complete ダイアログボックスの Yes をクリックします。
29. プレキャプチャパーリングワークフローの場合はハイブリダイゼーションのプロトコルが完了したら、Bravo デッキ 9 番にある、残ったライブラリプールが入っている Eppendorf twin.tec プレートを取り出し、シールをして-20°Cに保存します。

Step 3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャ

このステップでは自動化システムの SSEL Capture&Wash_XT_LL_ILM_v.B1.0.1.rst ランセットを使用し、ストレプトアビジン結合ビーズを使って DNA とキャプチャライブラリのハイブリッドをキャプチャします。キャプチャと洗浄のプロトコルのセットアップ(以下のステップ 1 から 103 ページのステップ 15 まで)は 100 ページで開始したサーマルサイクラでのハイブリダイゼーションのためのインキュベーションの間(約 1.5 時間)に完了してください。

キャプチャと洗浄のランセットでは表 73 に示す試薬を使用します。

表 73 キャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 102
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 102
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 102
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Follow storage recommendations provided by supplier (see Table 1 on page 9)	page 101

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. 赤いアルミニウムインサートを Bravo デッキ 4 番におきます。
4. Bravo デッキ 6 番に Deep Well プレート用のシルバーインサートをおきます。このインサートはキャプチャと洗浄の間 Deep Well ソースプレートへ熱伝導を促進するために必要です。シルバーインサートにソースプレートをセットする際には、適切に熱が伝わるようプレートが正しくセットされているか確認してください。

Dynabeads streptavidin ビーズの準備

5. 保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気ビーズをボルテックスミキサーでよく攪拌し再懸濁します。
6. 磁気ビーズを以下の手順で洗浄します。
 - a. コニカルチューブに表 74 に示す試薬を混合します。液量は余剰分を含みます。

表 74 磁気ビーズ洗浄混合液の調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 bead suspension	50 µL	425 µL	825 µL	1225 µL	1.65 mL	2.5 mL	5.0 mL
SureSelect Binding Buffer	0.2 mL	1.7 mL	3.3 mL	4.9 mL	6.6 mL	10 mL	20 mL
Total Volume	0.25 mL	2.125 mL	4.125 mL	6.125 mL	8.25 mL	12.5 mL	25 mL

- b. ボルテックスミキサーで 5 秒攪拌します。

5 ハイブリダイゼーション

- c. Dyna magnetic separator (Invitrogen Dynamag-15 または-50)等のマグネットにチューブをセットします。
- d. 上清を取り除き廃棄します。
- e. step a から d までの洗浄を合計 3 回繰り返します。(各洗浄ではビーズを残し、表に示した量の SureSelect Binding Buffer を新しく分注し混合します。)

7. 表 75 に従い、SureSelect Binding Buffer にビーズを再懸濁します。

表 75 SSELCapture&Wash_XT_HS2_ILM 用磁気ビーズの調製

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
SureSelect Binding Buffer	0.2 mL	1.7 mL	3.3 mL	4.9 mL	6.6 mL	10 mL	20 mL

8. 洗浄したストレプトアビジンビーズを Agilent Deep Well プレートに分注します。Agilent Deep Well プレートの使用する各ウェルに 200 μ L の均一なビーズ懸濁液を加えます。使用するサンプル数に合わせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番でビーズを入れてください。

9. ストレプトアビジンビーズが入ったソースプレートを Bravo デッキ 5 番におきます。

キャプチャと洗浄溶液ソースプレートの調製

10. 30 mL の Nuclease-free water を入れた Agilent shallow well reservoir を準備します。
11. Wash #1 と書いた Eppendorf twin.tec ソースプレートを準備します。使用する各ウェルに 150 μ L の SureSelect Wash Buffer 1 を加えます。
12. Wash #2 と書いた Agilent Deep Well ソースプレートを準備します。使用する各ウェルに 1150 μ L の SureSelect Wash Buffer 2 を加えます。

ワークステーションへのセット

13. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 76 に従い Labware MiniHub にプレート等をセットします。

表 76 SSELCapture&Wash_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	Wash #1 Eppendorf twin.tec source plate	—	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 10	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	—	—	Empty tip box

14. 表 77 に従い Bravo デッキにプレート等をセットします(デッキ 5 番には既にセットされています)。

表 77 SSELcapture&Wash_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Agilent 2 mL square well)
4	Empty red insert
5	Dynabeads streptavidin bead Deep Well source plate
6	Wash #2 Deep Well source plate seated on silver Deep Well insert

15. 表 78 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 78 SSELcapture&Wash_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	2 Tip boxes	—	—	—
12	4 Tip boxes	—	—	—

SSELcapture&Wash_XT_HS2_ILM の実行

サーマルサイクラのプログラムが segment5 の 65°C Hold ステップに到達している状態、100 ページでスタートしたハイブリダイゼーションのインキュベーションが完了後(約 1 時間)、SSELcapture&Wash_XT_LL_ILM をスタートします。

SSELcapture&Wash_XT_LL_ILM の実行には約 2 時間かかります。オペレーターは表 79 に示す 2 つの作業をランセットの間に行う必要があります。表の時間は目安です。各作業はランセット中の適切なときに VWorks から指示が表示されるので、その時点で行ってください。

表 79 SSELcapture&Wash_XT_HS2_ILM プロトコル中に必要なオペレーターの操作

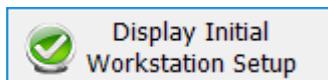
Operator action	Approximate time after run start
Transfer hybridization reactions from thermal cycler to NGS workstation	<5 minutes
Remove PCR plate from red aluminum insert	<5 minutes

16. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から SSELcapture&Wash_XT_HS2_ILM を選択します。

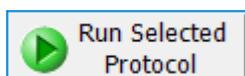
17. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 4 番にセットした PCR プレートを選択します。

5 ハイブリダイゼーション

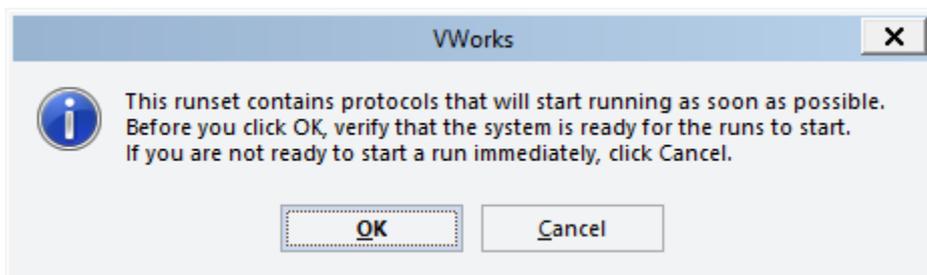
18. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
19. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



20. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
21. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
22. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



23. ランの準備ができたなら、以下のウィンドウの OK をクリックします。



CAUTION

次の step 24 を迅速かつ注意深く行うことが重要です。サンプルプレートの温度を 65°C に保ったまま素早く Bravo に移します。プレートのシールをはがす際にサンプルが飛び散るのを防ぐため、傾けたり急に動かしたりしないでください。サンプルプレートを Bravo デッキに移す前にデッキの温度と試薬の位置が正しくセットされ、自動化システムの準備が完了していることを確認してください。

24. 以下に示す指示が VWorks に表示されたら、65°C に維持されているハイブリダイゼーション反応液が入った PCR プレートをサーマルサイクルから取り出し、素早く Bravo デッキ 4 番の赤いアルミニウムインサートにセットします。溶液が飛び散らないように注意してシールを剥がし、ランセットを再開させるために **Continue** をクリックします。

Add Hyb Plate

Complete the following steps as quickly as possible:

Retrieve Hybridization plate from thermocycler, and place on RED INSERT at Bravo Position 4 and unseal.

Click Continue to resume protocol.

User data entry:

25. 以下に示す指示が VWorks に表示されたら、Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを取り除きます。赤いアルミニウムインサートは載せたままにしておきます。完了したらランセットを再開させるため、**Continue** をクリックします。

Update Bravo Deck

Remove PCR plate from Position 4.

Leave RED INSERT at Position 4 for next protocol.

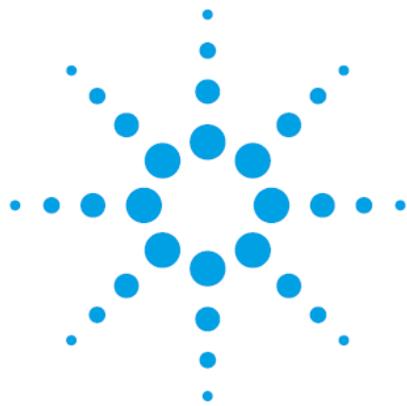
User data entry:

SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1 の残りの工程は約 1.5~2 時間かかります。ランセットが完了後、キャプチャされビーズに結合した DNA サンプルは Bravo デッキ 9 番に Eppendorf プレートに入った状態になります。

ランセットが完了したら PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートにシールします。設定は 165°C、1 秒です。プレートは次の自動化プロトコルのセットまで氷上に置いておきます。

NOTE

キャプチャされた DNA はキャプチャ後の増幅ステップの間、ストレプトアビジンビーズに吸着しています。



6 マルチプレックスシーケンスのための キャプチャ後サンプル調製

Step 1. キャプチャライブラリの増幅.....	107
Step 2. AMPure XP ビーズによる増幅したキャプチャ後ライブラリ の精製.....	113
Step 3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	116
Step 4. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional)	122
Step 5. シーケンスサンプルの調製	126
Step 6. シーケンスの開始とデータ解析.....	128

この章では、キャプチャしたライブラリを増幅、精製、品質確認と定量を行う工程を示しています。ポストキャプチャプール方式の、インデックスと分子バーコードが含まれたサンプルをプールする内容も含まれています。

Step 1. キャプチャライブラリの増幅

このステップでは、自動化システムは SureSelect で濃縮された DNA サンプルの PCR 増幅のための調製を行います。PCR プレートをワークステーションで準備後、増幅のためにサーマルサイクラにプレートを移す必要があります。

キャプチャライブラリのサイズにより、増幅のサイクル数が異なります。同じプレートには同じようなサイズのキャプチャライブラリを使用しサンプルの増幅を行えるよう、実験計画を立ててください。推奨のサイクル数は 108 ページの表 82 を参照にしてください。

このステップでは表 80 に示す試薬を使用します。実験を始める前に表に記載されている試薬を溶解し氷上におきます。各試薬は使用前に表に従って混合してください。

表 80 キャプチャ後 PCR 増幅で使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	page 108
5x Herculase II Reaction Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	page 108
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	page 108

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、PCR マスターミックスはラボで決められたクリーンエリアもしくは UV 滅菌灯を備えた PCR フード内で陽圧の環境で調製してください。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. チラーの電源を入れ、0°Cに設定します。Bravo デッキの 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
4. 30 mL の nuclease-free water を入れた Agilent shallow well reservoir を準備します。リザーバー内の nuclease-free water に気泡がないことを確認します。プロトコルの後 Water リザーバーは AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) protocol で再利用します。
5. 4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番と 6 番の温度を 4°Cに設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に、デッキ 6 番は CPAC 2 2 に相当します。

サーマルサイクラの準備

1. 表 81 のプログラムをサーマルサイクラに設定します(蓋は加熱します)。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおして蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 81 キャプチャ後 PCR 増幅サーマルサイクラのプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10 to 16 See Table 82 for recommendations based on probe design size	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

*サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 50 µL に設定してください。

表 82 キャプチャ後 PCR サイクル数の推奨

Probe Size/Description	Cycles
Probes <0.2 Mb	16 cycles
Probes 0.2–3 Mb	12–16 cycles
Probes 3–5 Mb	11–12 cycles
Probes >5 Mb (including Human All Exon Probes)	10–11 cycles

キャプチャ後PCRマスターミックスとマスターミックスソースプレートの調製

1. 表 83 に従い、適切な量のキャプチャ後 PCR マスターミックスを調製します。ボルテックスミキサでよく混合し氷上に置いておきます。

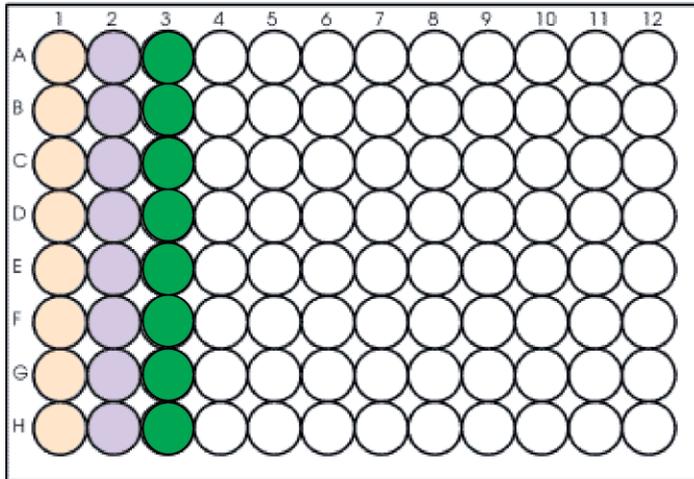
表 83 キャプチャ後 PCR マスターミックスの調製

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
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340 µL	425 µL	574 µL	1105 µL
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 µL	17.0 µL	25.5 µL	34.0 µL	42.5 µL	57.4 µL	110.5 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17.0 µL	25.5 µL	34.0 µL	42.5 µL	57.4 µL	110.5 µL
Total Volume	12.0 µL	204.0 µL	306.0 µL	408.0 µL	510.0 µL	688.8 µL	1326.0 µL

2. Hyb_XT_HS2_ILM プロトコルと同様の Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートを使用し、表 84 を参照にカラム 3 の全ての Well に PCR マスターミックスを分注します。マスターミックスソースプレートは最終的な配置を図 15 に示します。

表 84 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Post-Capture PCR Master Mix	Column 3 (A3-H3)	23.0 μ L	36.0 μ L	49.0 μ L	62.0 μ L	82.0 μ L	163.0 μ L



Block Master Mix
 Capture Library Hyb Master Mix
 Post-Capture PCR Master Mix

図 15 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 Eppendorf twin.tec master mix source plate の配置

以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています

3. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
4. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。

ワークステーションへのセット

1. 表 85 に従い、Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 85 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	–	–	–	–
Shelf 4	–	–	–	–
Shelf 3	–	–	–	–
Shelf 2	New tip box	Nuclease-free water reservoir from step 4	–	–
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	–	–	Empty tip box

2. 表 86 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 86 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Captured DNA bead suspensions in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
9	Master mix plate containing PCR Master Mix in Column 3 (unsealed)

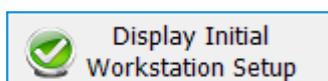
3. 表 87 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 87 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

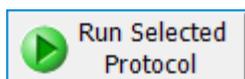
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	–	–	–
2	1 Tip box	–	–	–
3	1 Tip box	–	–	–
4	1 Tip box	–	–	–
6	1 Tip box	–	–	–
12	1 Tip box	–	–	–

Post-CapPCR_XT_HS2_ILMの実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Post-CapPCR_XT_HS2_ILM を選択します。
2. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択します。
3. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
4. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

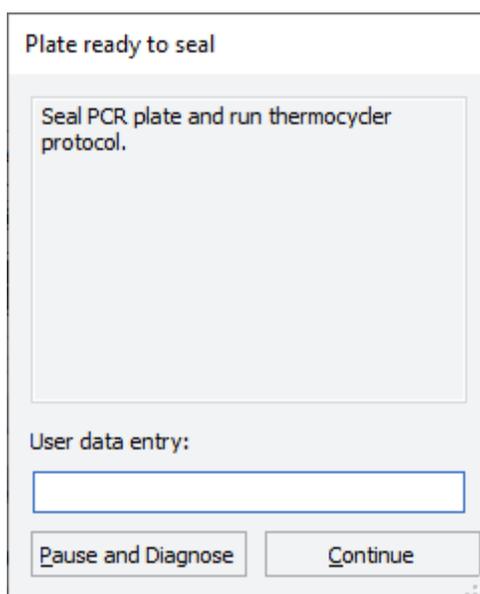


5. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
6. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
7. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM protocol の実行には約 15 分かかります。完了すると、PCR にかけるサンプルが Bravo デッキ 6 番の PCR プレートに入った状態になります。

8. 以下の指示が表示されたら Bravo デッキ 6 番から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。



9. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

10. プログラムをセットしたサーマルサイクラにサンプルを移す前にサーマルサイクラの Play ボタンを押し、表 81 のプログラムを開始しブロックの温度を 98°C にします。98°C に到達したらすぐにサンプルプレートにサーマルサイクラのブロックにセットし蓋を閉めます。
11. PCR 増幅プログラムが完了したら、サンプルプレートを遠心し、氷上で保存します。

Step 2. AMPure XPビーズによる増幅したキャプチャ後ライブラリの精製

このステップでは自動化システムで AMPure XP ビーズを DNA サンプルプレートに移し、ビーズに結合したDNAを集め、洗浄する操作を行います。

ワークステーションの準備

1. Bravo デッキ 9 番に残っている Pre-capture PCR master mix を分注した Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートは、後の TS_HighSensitivity_D1000 プロトコルで使用します(116 ページの“Option 1: Agilent 4200 TapeStation と High Sensitivity D1000 アッセイを使用する場合”を参照)。それ以外の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭きます。
3. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 45°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
4. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキ 9 番が担当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
5. 30 mL の水が入った Agilent shallow well reservoir を用意します。Post-CapPCR_XT_HS2_ILM プロトコルで使用した同様の Reservoir を再利用するか、新しく用意します。リザーバー内の水中に気泡がないことを確認します。気泡がある場合はピペットチップで取り除いてください。
6. 50 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。
7. 表 88 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。プレートの向きは図 4 を参照します。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 88 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Aliquoted AMPure XP beads in Agilent Deep Well plate from page 42 (50 µL of beads/well)	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty Eppendorf twin.tec Plate	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 5	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 6	—	Empty tip box

8. 表 89 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします

表 89 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
9	Amplified DNA libraries or library pools in unsealed PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

9. 表 90 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 90 AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) 用 BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

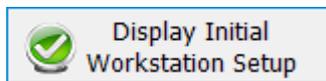
AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR)の実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR) を選択します

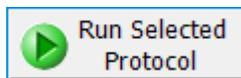
NOTE

AMPure XP 精製プロトコルは、SureSelect 自動化システムの複数のステップで使用します。自動化プロトコルを開始する際に正しいワークフローのステップを選択しているか確認してください。

2. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 9 番にセットした PCR プレートを選択します。
3. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
4. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



5. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
6. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
7. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします



精製プロトコルの実行には約 45 分かかります。完了すると精製された DNA サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

Step 3. シーケンスライブラリDNAの定量とサイズ確認

サンプル解析は以下のオプションから選択できます。

- ・ **Option 1:** 分析用のプレートを自動化システム(TS_HighSensitivityD1000)を用いて準備し、4200 TapeStation を用いて行う (116 ページの Option 1: Agilent 4200 TapeStation と High Sensitivity D1000 アッセイを使用する場合を参照)
- ・ **Option 2:** 手動で分析サンプルを調製し、Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent 4200 / 4150 TapeStation、または Agilent 5200/5300 Fragment Analyzer で分析を行う(121 ページの Option 2: その他のプラットフォームを用いた解析 (マニュアル) を参照)

Option 1: Agilent 4200 TapeStationとHigh Sensitivity D1000アッセイを使用する場合

ここでは 2 μ L の DNA サンプルと 2 μ L の High Sensitivity D1000 Sample buffer を混合し、High Sensitivity D1000 アッセイ用サンプルプレートを自動化プロトコル TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro を用いて調製します。調製後、アッセイプレートを 4200 TapeStation に移し解析を行います。詳細は別途 High Sensitivity D1000 Kit のマニュアルをご参照ください。TapeStation 分析用試薬は 30 分以上室温に戻してから使用します。

ワークステーションと Sample Buffer ソースプレートの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキの 9 番を室温に戻すためチラーの電源を切ります (p. 21 参照)。
4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. Hyb_XT_LL_ILM_v.B1.0.1.pro のランに使用した Eppendorf twin.tec プレートを 使用し、Sample Buffer ソースプレートを室温で調製します。表 91 に従い、カラム 4 の各ウェルに High Sensitivity D1000 Sample Buffer を加えます。Sample Buffer ソースプレートの最終的な配置は図 16 に示します。

表 91 TS_HighSensitivity_D1000 用 Sample Buffer プレートの調製

Solution	Position on Source Plate	Volume of Sample Buffer added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
High Sensitivity D1000 Sample Buffer	Column 4 (A4-H4)	8.0 μ l	11.0 μ l	14.0 μ l	17.0 μ l	23.0 μ l	44.0 μ l

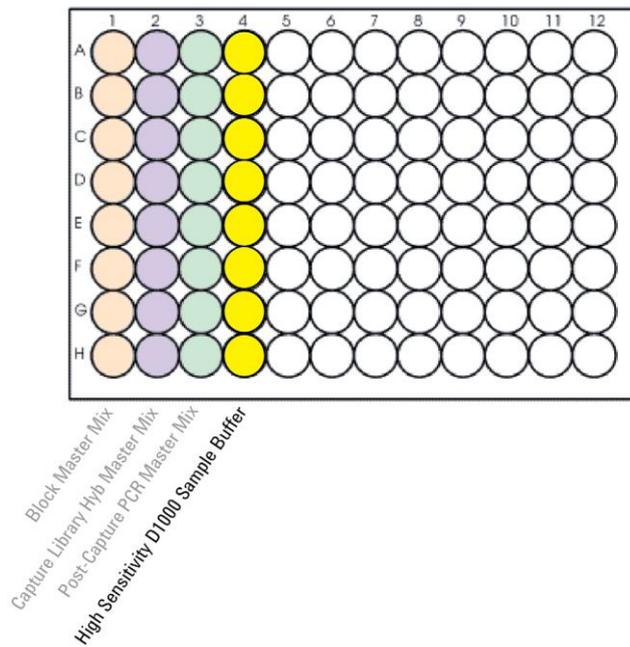


図 16 TS_High-Sensitivity_D1000 用 Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートの配置 以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています。

ワークステーションの準備

- 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 92 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 92 TS_HighSensitivity_D1000 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	New tip box	—	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	—	—	Empty tip box

- 表 93 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 93 TS_HighSensitivity_D1000 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Amplified post-capture libraries or library pools in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty Eppendorf twin.tec plate
9	Eppendorf twin.tec source plate containing High Sensitivity D1000 Sample Buffer in Column 4

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

CAUTION

Agilent 4200 TapeStation と自動化システムへのダメージを避けるため、アッセイプレートの調製の自動化には指定の Eppendorf twin.tec プレート (Eppendorf 型番 951020401 または 951020619) のみ使用してください。自動化プロトコルで調製したサンプルプレートを 2200 TapeStation の解析には使用しないでください。

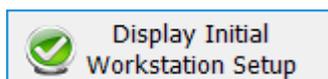
8. 表 94 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 94 TS_HighSensitivity_D1000 用 BenchCel の初期配置

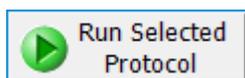
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

TS_HighSensitivity_D1000 の実行

9. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から **TS_HighSensitivity_D1000** を選択します。
10. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
11. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

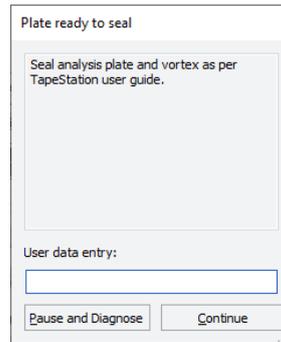


12. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
13. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
14. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします



TS_HighSensitivity_D1000 の実行には約 15 分かかります。解析用のサンプルを分取が完了後、Bravo デッキ 4 番にある DNA ライブラリサンプルプレートをシールし、のハイブリダイゼーションのセットアップで使用するまで氷上に置きます。

15. 以下の指示が表示されたら、Bravo デッキ 6 番にある解析用サンプルが入った Eppendorf twin.tec プレートを取出し、Continue をクリックしてください。D1000 アッセイプレートをフویلシールでシールし、ユーザーガイドに従ってボルテックスミキサで混合してください。

**CAUTION**

4200 TapeStation へのダメージを避けるため、指定の 96-well plate foil seals (Agilent 型番 5067-5154)のみを使用してください。

正確な定量のため、DNA と Sample buffer はボルテックスミキサで 1 分間混合し、完全に混合されていることを確認してください。その後、液を集めるためスピンドウンをしてください。

High Sensitivity D1000 アッセイでの泳動とデータの解析

16. ユーザーガイドに従い、解析用サンプルプレート、High Sensitivity D1000 ScreenTape、Loading tips を装置にセットしてください。泳動を開始します。
17. 泳動終了後、エレクトロフェログラムで期待される DNA フラグメントサイズのピークが得られているか確認します(表 95 のガイドラインを参照ください)。2 x 100 bp リード用に断片化された DNA から作製されたライブラリのエレクトロフェログラム例は図 17(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 18(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)および図 19(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。

表 95 ポストキャプチャライブラリのガイドライン

NGS read length for fragmentation protocol selection	Input DNA type	Expected library DNA fragment size peak position
2 x 100 reads	Intact DNA	300 to 400 bp
	FFPE DNA	200 to 400 bp
2 x 150 reads	Intact DNA	330 to 450 bp
	FFPE DNA	200 to 450 bp

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

18. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

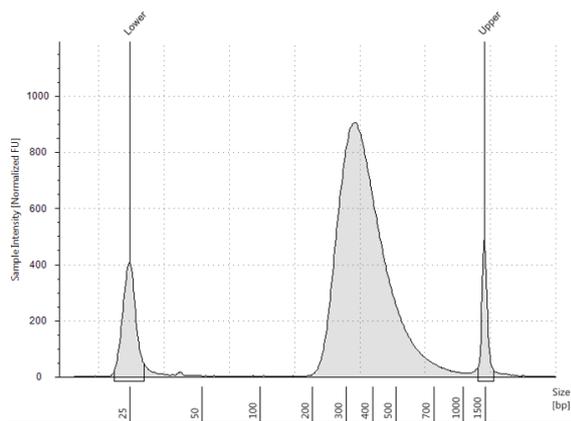


図 17 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図 (High Sensitivity D1000 アッセイ)

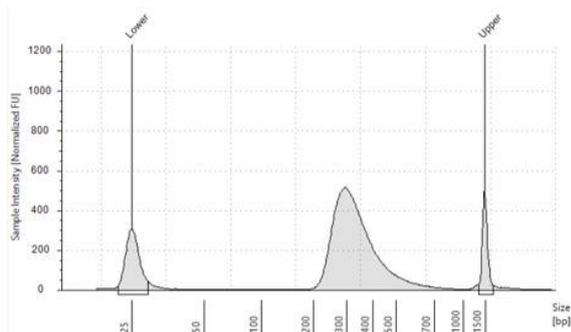


図 18 典型的な FFPE 由来 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

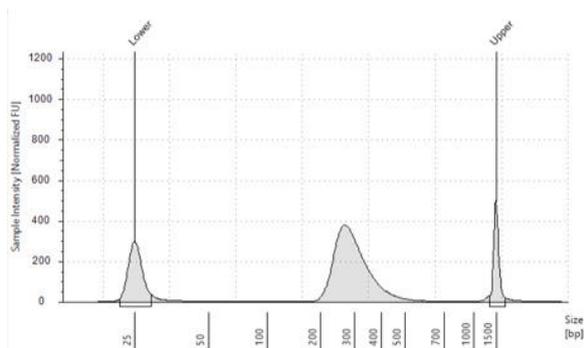


図 19 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図 (High Sensitivity D1000 アッセイ)

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし 4°Cで一晩、さらに長期保存の場合は-20°Cで保存してください。

Option 2: その他のプラットフォームを用いた解析 (マニュアル)

マニュアルでのサンプル調製を行い、Agilent 2100 バイオアナライザ、Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer、Agilent 4200/4150 TapeStation を用いて解析を行うことができます。得られるエレクトロフェログラムは 4200 TapeStation と同様なフラグメントサイズプロファイルになることが期待されます。泳動終了後、エレクトロフェログラムで期待される DNA フラグメントサイズのピークが得られているか確認します。分析オプションについて表 96 を参照ください。

表 96 ポストキャプチャライブラリ分析オプション

Analysis platform	Assay used at this step	Link to assay instructions	Amount of library sample to analyze
Agilent 4200 or 4150 TapeStation system	High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide	2 µL
Agilent 2100 Bioanalyzer system	High Sensitivity DNA Kit	Agilent High Sensitivity DNA Kit Guide	1 µL
Agilent 5200, 5300, or 5400 Fragment Analyzer system	HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp)	Agilent HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Guide	2 µL

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし 4°Cで一晩、さらに長期保存の場合は-20°Cで保存してください。

Step 4. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional)

NOTE

プレキャプチャプール方式

キャプチャされた最終 DNA サンプルは、使用したプローブキャプチャライブラリやプレキャプチャプールの方法により、8 または 16 サンプルのインデックス付きライブラリがプールされています。お使いのシーケンシングプラットフォームによっては、8-plex または 16-plex サンプルをポストキャプチャのステップでさらに混合することができます。

ポストキャプチャでプールするかは、実験デザイン上必要なシーケンスデータ量と共に、使用するプラットフォームの出力性能に基づき 1 レーンで混合できるインデックス数を計算することで決定します。ポストキャプチャでプールする場合は、以下のガイドラインに従ってください。

ポストキャプチャ後にプールしない場合は、126 ページに進みます。

ポストキャプチャプール方式

1 つのシーケンスレーンにマルチプレックスできるインデックスライブラリの数は、研究デザインに必要なシーケンス量と、使用するプラットフォームの仕様により異なります。1 レーンあたりのマルチプレックス数は、使用するプラットフォームのキャパシティや、1 サンプルあたりに必要とするシーケンスデータ量により異なりますので、必ずイリミナ社の提供する最新のプロトコルをあわせて参照してください。

以下の手順に従い、各インデックスサンプルがプール中で等モル量になるように、ライブラリを混合します。

方法 1: プールするサンプルそれぞれを、1X Low TE を用いて終濃度が同じになるように希釈します (典型的な濃度は 4~15 nM、もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます)。その後、全てのサンプルを同じ容量混合して、最終的なプールを調製します。

方法 2: プールするサンプルは異なる濃度のまま、それぞれ適切な量を混合して、最終的にプール中で等モル量になるようにします。その後、プールを 1X Low TE を用いて必要とされる容量にします。以下の式はプールに加える各インデックスサンプルの量を計算するための式です。

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

(典型的な濃度は 4 nM~15 nM、もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます。)

#: プールするインデックスの数

C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 97 に 4 種のインデックスサンプル(それぞれ異なる初期濃度)の量と、最終的に 20 μ L の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

表 97 10 nM の濃度でトータル 20 μ L に調製する計算例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use (μ L)
Sample 1	20 μ L	20 nM	10 nM	4	2.5
Sample 2	20 μ L	10 nM	10 nM	4	5
Sample 3	20 μ L	17 nM	10 nM	4	2.9
Sample 4	20 μ L	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

自動化システムを用いたサンプルのプール (方法 2 のオプション)

方法 2 のオプションとして行うことができます。このステップは自動化システムを使わずにマニュアルで行うことも可能です。

- 図 20 のヘッダーを参照に.csv (comma separated value) ファイルを作成します。ヘッダーの文字はスペースを含まないようにしてください。この表は Microsoft の Excel などのスプレッドシート作成アプリケーションを使って作成し、保存する際に.csv フォーマットにすることもできます。このファイルはプレートの全 96 ウェル分の行(rows)を含む必要があります。
- 各 DNA サンプルについてヘッダーの項目に関する情報を入力します。
 - SourceBC の列にはサンプルプレートの内容、またはバーコードを入力します。SourceBC の列は、全ての row で同じになります。
 - SourceWell の列にはサンプルが入っているウェルの位置を入力します。ソースプレートとして Eppendorf twin.tec プレートを使用してください。
 - DestinationWell の列には、サンプルをプールするウェルを入力します。
 - Volume の列には、Source Well から Destination Well にうつすサンプルの液量(μ L)を入力します。使用しないウェルの行は削除します。

	A	B	C	D
1	SourceBC	SourceWell	DestinationWell	Volume
2	abc	A1	A1	4.711292
3	abc	B1	A1	6.37105
4	abc	C1	A1	7.000448
5	abc	D1	A1	3.81144
6	abc	E1	A1	9.539072
7	abc	F1	A1	7.802747
8	abc	G1	A1	8.835171
9	abc	H1	A1	6.313131
10	abc	A2	A1	5.976286
11	abc	B2	A1	6.601183
12	abc	C2	A1	7.14449
13	abc	D2	A1	5.66431

図 20 方法 1 および方法 2 で使用するサンプルスプレッドシート

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

NOTE

サンプルスプレッドシートは以下のフォルダに保存されています。

C:\¥VWorks Workspace¥NGS Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Aliquot Input File Templates¥Aliquot_Captures_Template.csv (x.x.x はバージョン番号)

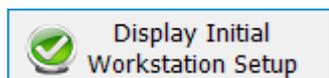
Aliquot_Captures_Template.csv ファイルをコピーし、各 Aliquot_Water ランの csv ファイルを作成するためのテンプレートとして使用できます。12 カラム(96 サンプル)より少ないランのテンプレートとして使用する場合、使用しない Well の情報は削除してください。

3. VWorks ソフトウェアがインストールされている PC の以下のフォルダに.csv ファイルをロードします。
C:\¥VWorks Workspace¥NGS Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Aliquot Input File Templates
4. チラーの電源を入れ、0°Cに設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
5. 表 98 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 98 Aliquot_Captures 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
5	Empty Agilent Deep Well plate
6	Empty tip box
8	New tip box
9	Purified amplified indexed libraries in Eppendorf twin.tec plate

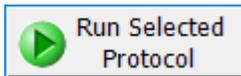
6. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Aliquot_Captures を選択します。
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. 123 ページのステップ 1~3 で準備した csv ファイルをアップロードします。
 - a. Form 画面の「Select Aliquot input file」の“...”をクリックします。



- b. csv ファイルの保存場所を開き、ファイルを選択して Open をクリックします。Window が閉じたら、Select Aliquot Input File に選択したファイルが表示されているか確認します。
9. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
 10. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
 11. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



Aliquot_Libraries の実行には 96 サンプルで約 1 時間かかります。DNA サンプルプレートは Bravo デッキ 5 番のプレートに入った状態になります。

12. デスティネーションプレートを Bravo デッキから取り出します。
13. 各 Well にシーケンスを行うのに適切な濃度となるよう、Low TE を加えます。
もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 を 0.1% v/v になるように加え、-20°C で保存します。短期保存に限ります。

Step 5. シーケンスサンプルの調製

最終的な SureSelect XT HS2 ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な Paired-end プライマーとケミストリでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 21 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

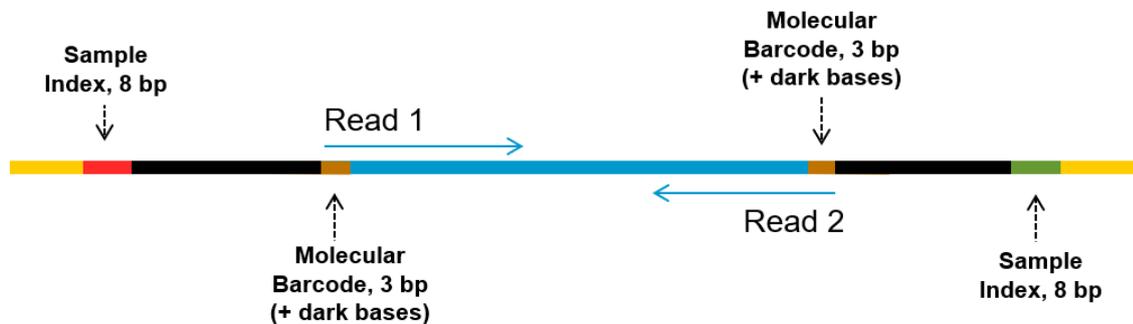


図 21 SureSelect XT HS2 シーケンスライブラリの構造

各断片では、1 つのターゲットインサート(青)はイルミナ paired-end シーケンスエレメント(黒)とユニークデュアルインデックス(赤および緑)、Duplex 分子バーコード(茶)、ライブラリブリッジ PCR プライマ(黄)が付加されています。

ライブラリはイルミナ社 HiSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq プラットフォームでシーケンスすることができます。使用するランタイプとケミストリの組み合わせは表 99 をご覧ください。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスタ増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は表 99 に示されています。

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチライブラリに最適なシーディング濃度は、使用するシーケンスプラットフォーム、ランタイプ、イルミナ社キットのバージョンにより異なります。ガイドラインについては表 99 を参照してください。シーディング濃度とクラスタ密度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、求められるアウトプットやデータの質に基づき、最適化が必要な場合があります。表 99 の内容に記載されている範囲の中間のシーディング濃度から最適化を行ってください。

より良好なシーケンス QC のための低濃度のスパイクインによる PhiX コントロールにつきましては、イルミナ社の推奨に従ってください。

表 99 イルミナ社キット選択ガイドライン

Platform	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry	Seeding Concentration
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	12–14 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2	9–10 pM
MiSeq	All Runs	2 × 75 bp	150 Cycle Kit	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	200–400 pM

*単一の 200-cycle kit には 8bp の i7 と i5 インデックスを加えて、Reads 1 と Reads 2 をシーケンスするのに十分な試薬が含まれていません。200 cycle kit と 50 cycle kit を 1 つずつ組み合わせて使用することができます。

Step 6. シーケンスの開始とデータ解析

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンスのランセットアップと解析の概要です。

- ・サンプルレベルインデックスには 8 bp のインデックスリードが必要です。インデックス塩基配列情報については、141 ページ 表 110 から 148 ページ 表 117 をご参照ください。
- ・HiSeq・NextSeq・NovaSeq プラットフォームでは、装置のユーザインターフェースからランのセットアップを行いません。129 ページのガイドラインに従ってください。
- ・MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM) を用いてランのセットアップを行います。129～130 ページに記載されている手順に従い、カスタムサンプルシートを作成します。
- ・Illumina IEM adaptor trimming option は使用しないでください。シーケンスランをセットする際に IEM adaptor trimming option のチェックボックスが選択されていないことを確認します。アダプターは後述の Agilent 社のソフトウェアを用いてトリミングされ、アダプター配列内の分子バーコード (MBC) が適切に処理されるようにします。
- ・Illumina 社の bcl2fastq、BCL Convert または DRAGEN ソフトウェアでデマルチプレックスを行い、デュアルインデックスに基づくペアエンドリードを作成し、P5 および P7 の間違っただペアを除きます。Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) や Alissa Reporter、SureCall ソフトウェアを使用して FASTQ ファイルの処理を行う場合には、Illumina 社 demultiplexing software の MBC/UMI trimming option を使用しないでください。
- ・分子バーコード (MBC) と dark base は、リード 1 およびリード 2 の 5' 端にあります。MBC 除去とトリミングは Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) を使用してください (詳細は 132 ページを参照してください)。もしお使いのシーケンス解析パイプラインに MBC 解析がなく、AGeNT と互換性がない場合、132 ページの Note にあるように、アライメント前に各リードの最初の 5 塩基をトリミングするかマスクしてください。
- ・ヒト生殖細胞系列 DNA の変異解析には、Agilent Alissa Reporter software を使用して FASTQ ファイルから変異の検出までを行うことができます。詳細は 132 ページを参照してください。
- ・生殖細胞または体細胞系列変異の解析には、Agilent AGeNT ソフトウェアを使用して FASTQ ファイルの処理から解析前の BAM ファイルの生成までを行うことができます。詳細は 133 ページを参照してください。

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

装置のコントロールソフトウェアの画面から、表 100 に従ってシーケンスのランセットアップを行います。HiSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面の Run configuration スクリーンで Dual Index を選び表 100 のサイクル数を入力します。

NextSeq または NovaSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面で Run Setup スクリーンを立ち上げ、表 100 のリード長を入力します。カスタムプライマーセクションでは、すべてのプライマー (Read1, Read2, Index1 および Index2) のチェックボックスを外します。

表 100 ラン設定

Run Segment	Cycles/Read Length
Read 1	100 or 150
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	100 or 150

MiSeqプラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM) ソフトウェアを用いてカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT HS2 インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS2 システムのインデックス塩基配列は、141~148 ページを参照してください。

カスタム Sample Sheet のセットアップ

- IEM ソフトウェア中で、以下の Workflow を選択し、MiSeq プラットフォームの Sample Sheet を作成します。
 - Category から Other を選択
 - Application から FASTQ Only を選択
- Workflow Parameters 画面上で、ラン情報を入力し、下図でハイライトしているキーとなるパラメータが、下図の内容になっていることを確認します。
Library Prep Workflow の項目は、TruSeq Nano DNA を選択します。Index Adapters の項目は TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes) を選択します。アダプタートリミングはアジレント AGeNT で行う必要があるため、FASTQ Only Workflow-Specific Setting の adaptor-trimming チェックボックス (下図赤で囲んだ部分) は両方とも外します。
もし TruSeq Nano DNA が Sample Prep Kit の項目にない場合は、代わりに TruSeq HT を選択します。

6 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

FASTQ Only Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*

Library Prep Workflow

Index Adapters

Index Reads 0 (None) 1 (Single) 2 (Dual)

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

* - required field

FASTQ Only Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Reverse Complement

Use Adapter Trimming

Use Adapter Trimming Read 2

- Sample Sheet Wizard を使用して、シーケンスする各サンプルの必要な情報を入力して、セットアップします。I7 Sequence カラムには、各サンプルをいずれかの Illumina の i7 インデックスに割り当てます。インデックスは後のステップで SureSelect XT HS2 インデックスに変更します。同様に、I5 Sequence カラムにも、いずれかの Illumina の i5 インデックスに割り当てます。I5 インデックスも後のステップで SureSelect XT HS2 インデックスに入力内容を変更します。

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

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

- Sample Sheet セットアップタスクを終了し、Sample Sheet を保存します。

SureSelect XT HS2 デュアルインデックスを含めるための Sample Sheet の編集

- Sample Sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、コラム 5~8 の i7、i5 のインデックス情報を変更します(下図、黄色くハイライトされた部分)。SureSelect XT HS2 インデックスの塩基配列は 141~148 ページをご覧ください。
- 5 番目の I7_Index_ID コラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。6 番目の index コラムには、適切な P7 インデックス配列を入力します。
- 7 番目の I5_Index_ID コラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。8 番目の index2 コラムには、適切な P5 インデックス配列を入力します。
- 96 サンプル以上のランを行うときには、SureSelect XT HS2 インデックスペア配列が 6 番目のコラム (P7 インデックス) と 8 番目のコラム (P5 インデックス) を含むサンプル行を Sample Sheet に追加します。

[Header]									
Item	level 5								
Experiment	XT_Low_Input								
Date	#####								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Instrument	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index	Ada TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)								
Description									
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
	100								
	100								
[Settings]									
ReverseComplement	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_N	Sample_P	Sample_V	Index_Pla	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	Sample
Sample_1	Sample1	Plate1	A01	A01	A01	GTCTGTCA	A01	CAACGAGC	
Sample_2	Sample2	Plate1	B01	B01	B01	TGAAGAGA	B01	GTCGACAA	
Sample_3	Sample3	Plate1	C01	C01	C01	TTCACGCA	C01	AAGAGCCT	

図 22 SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンス用の Sample Sheet

5. ランを行うために編集した Sample Sheet を適切な場所に保管します。

データ解析リソース

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 ライブラリのデータ解析に適した典型的な NGS 解析パイプラインステップです。お使いの NGS 解析パイプラインによって異なります。

Illumina の bcl2fastq、BCL Convert または DRAGEN ソフトウェアを用いて、デュアルインデックスに基づいてマルチプレックスを行います。マルチプレックスされた FASTQ データは、後述のツールのいずれかを使用してアダプター配列の除去、MBC 配列の抽出の前処理を行う必要があります。

生殖細胞系列 DNA ワークフローで Agilent Alissa Reporter ソフトウェアを使用する場合

Alissa Reporter ソフトウェアは SureSelect 解析において FASTQ からフォーマットから VCF フォーマットへのデータの処理と、ヒト生殖細胞系列の SNV、InDel、CNV の検出のレポートまでのソリューションを提供します。

Alissa Reporter はクラウドベースのマルチテナントのサービスとしてのソフトウェア (SaaS) 製品で、SureSelect XT HS2 DNA ライブラリリードの前処理 (アダプタートリミング、MBC 抽出、デデュプリケーション) から 2 次データ解析、QC 解析までをビルトインのダッシュボード中で行うことができます。詳細については www.agilent.com の [Alissa Reporter 製品ページ](#) を参照ください。

SureSelect XT HS2 DNA アッセイで Alissa Reporter ソフトウェアを使用する前に考慮すべき重要な事柄については、以下の要約を参照ください。

- Alissa Reporter アプリケーションはプレデザインあるいはカスタムの SureSelect human probe を用いて濃縮されたヒト DNA ライブラリの生殖細胞系列の変異解析に使用できます。SureSelect XT HS Human All Exon V7 または V8 プローブを用いてエンリッチしたライブラリは、Alissa Reporter 中の対応する Human All Exon V7 Germline または Human All Exon V8 Germline アプリケーションを利用して解析します。その他のプローブ (プレデザインプローブを含む) を用いて濃縮されたライブラリは、Alissa Reporter のカスタムアプリケーションを利用して解析します。Alissa Reporter コンソールからは、プレデザインのプローブとカスタムプローブの両方を SureDesign からインポートし、新しいカスタムアプリケーションをセットアップするためのツールが提供されています。

NOTE

Human All Exon V8+UTR と Human All Exon V8+NCV デザインは、Alissa Reporter 内のカスタムタイプのアプリケーションを利用してインポートする必要があります。Human All Exon V8 Germline アプリケーションを含むカタログタイプのアプリケーションは特定のデザインのみに対応しており、その他のデザインには対応していません。

- 体細胞変異検出のための FFPE 由来あるいはその他の DNA サンプルの解析には現時点で対応していません。
- CNV コールには、同一 Alissa Reporter ランからの無関係なサンプルを使用して、ターゲットサンプルのレファレンスシグナルを決定する共同分析ストラテジーが使用されます (特定のレファレンスサンプルは必要ありません)。CNV コールのための信頼できるレファレンスシグナルを得るためには、少なくとも 3 つ、好ましくは 8 つ (またはそれ以上) の無関係なサンプルと一緒に Alissa Reporter で分析される必要があります。X 染色体および Y 染色体上の CNV コールには、同性の無関係なサンプルが必要です。最良の結果を得るためには、処理に基づくばらつきを最小限に抑えるため、CNV 共同解析に使用するサンプルは、同じ SureSelect ランおよび同じシーケンスランで CNV 共同解析に使用するサンプルを処理してください。
- アップロード可能なファイルサイズは最大 50GB/ファイル (合計 400GB/サンプル) です。また、アップロ

ード可能な FASTQ ファイル数は最大 768 個です。

- ・ Human All Exon V7 Germline または Human All Exon V8 Germline アプリケーションを使用するとき、ファイルサイズが 150M を超える場合には、ランダムに 150M リードにサブサンプリングされます。
- ・ 未マージおよびマージの FASTQ ファイルに対応しています。BAM ファイルやその他の FASTQ 以外のファイル形式のアップロードには対応していません。

生殖細胞または体細胞系列DNAのワークフローで Agilent AGeNT ソフトウェアを使用する場合

Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) は SureSelect XT HS2 DNA ライブラリのリード処理ステップに使用できる Java ベースのソフトウェアモジュールで、分子バーコード(MBC)処理したアダプタートリミングとデブリケートリードを認識します。この toolkit は、バイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、インターナルな解析パイプラインの構築、統合、メンテナンスおよびトラブルシュートができるようにデザインされています。詳細な情報や toolkit のダウンロードは www.agilent.com の [AGeNT 製品ページ](#)製品ページおよび [AGeNT Best Practices](#) をご覧ください。

デマルチプレックスを行った FASTQ データは、AGeNT を用いて前処理し、シーケンシングアダプタのトリミングおよび MBC 配列の抽出を行う必要があります。

トリミングしたリードはアラインされ、BWA-MEM のような適切なツールでアラインした BAM ファイルに MBC タグを付加します。アライメントとタグ付けが完了すると、AGeNT の CReaK (Consensus Read Kit) モジュールを用いてコンセンサスリードの生成やデブリケートのマーク付けまたは除去します。BAM ファイルは、バリエーション探索を含む下流の解析に使用できます。

NOTE

CReaK は AGeNT version 3.0 内のデデブリケーションツールであり、従来の AGeNT LocatIt の代替として含まれています。LocatIt と CReaK の違いについての詳細は www.agilent.com の [Agent 製品ページ](#)の FAQ を参照してください。LocatIt は引き続き使用可能ですが、CReaK の使用を推奨しています。

NOTE

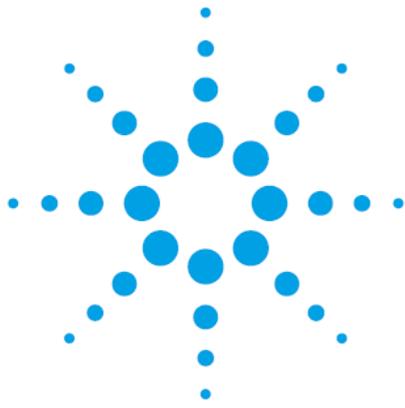
お使いの解析パイプラインで MBC 配列を除去する場合、次の解析ステップに進む前にリード 1 およびリード 2 の最初の 5 塩基をマスキングまたはトリミングすることで MBC 配列を除去することができます。bcl2fastq を使用してデマルチプレックスをする場合、ベースマスク **N5Y*;I8,I8,N5Y***(*は実際のリード長に置き換えます: RunInfo.xml ファイルのリード長です)を含めることで、MBC 配列をマスキングすることができます。

BCL Convert を使用してデマルチプレックスをする場合、Sample Sheet のヘッダーに以下の文字列を含めることで MBC 配列を除去することができます:

OverrideCycles,N5Y*;I8,I8,N5Y* (*はトリミング後のリード長に置き換えます。例えば 2x150 NGS の場合は、N5Y145;I8,I8;N5Y145 となります。)

もしくは seqtk のような適切な処理ツールで、デマルチプレックスした FASTQ ファイルから各リードの最初の 5 塩基をトリミングすることも可能です。

あるいは、AGeNT のトリミングモジュールで MBC 配列に加えアダプター配列も除去できます。標準的なアダプタートリマーでは、反対側のアダプターの MBC 配列(図 21 参照)を除去することができず、アライメント品質に影響を与える場合があります。



7 Appendix: FFPE由来DNAサンプル の使用

FFPE 由来 DNA サンプル用のプロトコル変更.....	135
FFPE サンプルの品質確認.....	135
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨.....	136

この章では、FFPE サンプルからの DNA を用いる際、その分解度に基づいてプロトコルを一部変更する内容をまとめています。

FFPE由来DNAサンプル用のプロトコル変更

FFPE サンプルをお使いの際に、プロトコルに変更を加える内容を表 101 に示します。

表 101 FFPE サンプル用プロトコル変更内容一覧

Workflow Step and page	Parameter	Condition for non-FFPE Samples	Condition for FFPE Samples
gDNA Sample Preparation page 45	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
Enzymatic fragmentation duration page 48	Duration of the 37°C fragmentation step	15–25 minutes, depending on read length requirements	25 minutes
DNA input for Library Preparation page 45	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity (see Table 17 on page 46 and Table 18 on page 46)
DNA Shearing page 54	Mode of DNA Shearing	2 × 120 seconds	240 seconds (continuous)
Pre-capture PCR page 63	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing page 136	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity (see Table 102 and Table 103 on page 136)

FFPEサンプルの品質確認

DNA の分解度は Agilent NGS FFPE QC Kit もしくは Agilent TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape を用いて確認できます。

Agilent NGS FFPE QC Kit は、qPCR ベースのアッセイにより DNA サンプルの分解度を確認します。このキットを用いて確認することにより、結果として、サンプル中の増幅可能な DNA の量を正確に測定することができ、インプット DNA の量を調整することができます。また、得られた $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解スコアを元に、他のプロトコル変更内容を決定します。

Agilent TapeStation システムでは、Genomic DNA ScreenTape アッセイと組み合わせて、電気泳動により DNA Integrity Number (DIN) の値を算出することができ、インプット DNA 量やその他のプロトコル上の変更内容を決定します。

FFPEサンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨

分解していない DNA サンプルを用いて、研究目的にあった必要なシーケンスアウトプット量を決定した後、以下のガイドラインを参考にして FFPE DNA サンプルで必要な追加シーケンスアウトプット量を決定してください。

ΔΔCq で品質を確認したサンプルの場合:

ΔΔCq DNA 分解スコアで品質を確認している場合は、表 102 のガイドラインをご参照ください。例えば、ワークフローにおいて必要とされるカバレッジを得るためには、分解していない DNA サンプルで 100 Mb のアウトプットが必要な場合、ΔΔCq DNA が 1 の FFPE サンプルで、同程度のカバレッジを得るためには、200~400 Mb のシーケンスアウトプットが必要となります。

表 102 FFPE 由来の DNA サンプルに関する推奨シーケンスアウトプット

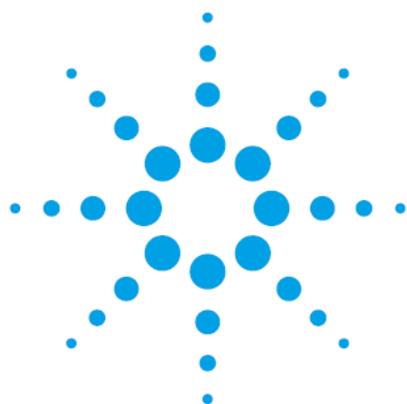
ΔΔCq value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
<0.5	No extra sequencing output
between 0.5 and 2	Increase sequencing allocation by 2x to 4x
>2	Increase sequencing allocation by 5x to 10x or more

DIN で品質を確認したサンプルの場合:

Genomic DNA ScreenTape アッセイの DIN の値で品質を確認している場合は、表 103 のガイドラインをご参照ください。例えば、ワークフローにおいて必要とされるカバレッジを得るためには、分解していない DNA サンプルで 100 Mb のアウトプットが必要な場合、DIN が 4 の FFPE サンプルで、同程度のカバレッジを得るためには、200~400 Mb のシーケンスアウトプットが必要となります。

表 103 FFPE 由来の DNA サンプルに関する推奨シーケンスアウトプット

DIN value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
≥8	No extra sequencing output
between 3 and 8	Increase sequencing allocation by 2x to 4x
<3	Increase sequencing allocation by 5x to 10x or more



8 リファレンス

キットの内容.....	138
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報.....	140
インデックスプライマーペアのプレートマップ.....	149
クイックリファレンス: マスターミックスとソースプレートの液量..	151
クイックリファレンス: その他の試薬の容量.....	156
トラブルシュートガイド.....	157

この章では、キットに含まれている試薬内容、インデックス配列、トラブルシュート情報、プロトコルのクイックリファレンスなどリファレンス情報について記載しています。

キットの内容

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントシステム プレキャプチャプールのプロトコルでは表 104 に示す試薬キットを使用します。表 104 で複数のキットから構成される製品の構成は、表 105 から表 108 に示します。

表 104 キットの構成

Kit Name (p/n)	Component Kit Name	Component Kit p/n	Storage Condition
SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), 96 Reactions (G9985A through G9985D)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	5500-0147	-20°C
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	5191-5688 (Index Pairs 1–96), 5191-5689 (Index Pairs 97–192), 5191-5690 (Index Pairs 193–288), OR 5191-5691 (Index Pairs 289–384)	-20°C
SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment Kit (Post PCR), 12 Hybs (G9987A)	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	5191-6689	Room Temperature
	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	5191-6690	-20°C
SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit, 96 Reactions (G9983A through G9983D; or G9984A through G9984D with AMPure XP/ Streptavidin Beads)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	5500-0147	-20°C
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	5191-5688 through 5191-5691	-20°C
	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	5190-9687	Room Temperature
	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	5191-6688	-20°C
	SureSelect DNA AMPure XP Beads (included with kits G9984A through G9984D)	5191-5740	+4°C
SureSelect Streptavidin Beads (included with kits G9984A through G9984D)	5191-5742	+4°C	
SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit, 96 Reactions Automation (5191-6764)			-20°C

表 105 SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR) の内容

Kit Component	Format
End Repair-A Tailing Enzyme Mix	tube with orange cap
End Repair-A Tailing Buffer	bottle
T4 DNA Ligase	tube with blue cap
Ligation Buffer	bottle
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix	tube with white cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

表 106 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR) の内容

Kit Component	Format
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	Orange 96-well plate (index pairs 1–96), OR Blue 96-well plate (index pairs 97–192), OR Green 96-well plate (index pairs 193–288), OR Red 96-well plate (index pairs 289–384)

表 107 SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 1 (Post PCR) の内容

Kit Component	Format
SureSelect Binding Buffer	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle

S

表 108 SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR) の内容

Kit Component	Format
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle
SureSelect XT HS2 Blocker Mix	tube with blue cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap
SureSelect Post-Capture Primer Mix	tube with clear cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5x Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは混合された状態で提供されます。各プライマーペアはユニークな 8 bp の P5 または P7 インデックスを含み、デュアルインデックスの NGS ライブラリを作成できます。各プライマーのインデックス部分の塩基配列は、141 ページ表 110 から 148 ページ表 117 を参照してください。8 bp インデックスのライブラリをシーケンスするラン設定は、129 ページをご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは、1 回分の液量を含みます。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、各ウェルはライブラリ調製反応 1 回のみ使用してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

各プライマーのインデックス部分の塩基配列は、表 110 から表 117 に記載されています。P7 インデックスは順方向で示され、サポートされるどのイルミナプラットフォームに適用されます。P5 インデックスは、異なるプラットフォームやシーケンスランのセットアップおよび管理ツール(例: Local Run Manager および Instrument Run Setup)で使用するために、2 つの方向(順方向および逆方向の補数)で示されています。イルミナシーケンスプラットフォームとその P5 シーケンスの方向を表 109 に示します。サンプルシートやシーケンシングランセットアップ時に P5 インデックスの向きを正しく入力することはデマルチプレックスを成功させるために非常に重要です。イルミナのサポートドキュメントおよびリソースも併せて参照し、アプリケーションに適した P5 インデックス鎖の向きを決定してください。

表 109 Illumina プラットフォームと P5 インデックスの方向

P5 Index Orientation	Platform
Forward	NovaSeq 6000 with v1.0 chemistry MiSeq HiSeq 2500
Reverse Complement*	NovaSeq 6000 with v1.5 chemistry NextSeq 500/550/1000/2000 HiSeq 3000/4000 iSeq 100 MiniSeq HiSeq X

*一部のランセットアップ・管理ツールでは入力された P5 インデックスの逆相補配列が自動的に作成されます。必ず Illumina 社のサポートドキュメントを参照し、パイプラインで使用するプラットフォームとツールの組み合わせについて確認し、ランセットアップ時に入力するインデックスの正しい方向を決定してください。

表 110 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 1~48 (オレンジ色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
1	A01	CAAGGTGA	ATGGTTAG	CTAACCAT	25	A04	AGATGGAT	TGGCACCA	TGGTGCCA
2	B01	TAGACCAA	CAAGGTGA	TCACCTTG	26	B04	GAATTGTG	AGATGGAT	ATCCATCT
3	C01	AGTCGCGA	TAGACCAA	TTGGTCTA	27	C04	GAGCACTG	GAATTGTG	CACAATTC
4	D01	CGGTAGAG	AGTCGCGA	TCGCGACT	28	D04	GTTGCGGA	GAGCACTG	CAGTGCTC
5	E01	TCAGCATC	AAGGAGCG	CGCTCCTT	29	E04	AATGGAAC	GTTGCGGA	TCCGCAAC
6	F01	AGAAGCAA	TCAGCATC	GATGCTGA	30	F04	TCAGAGGT	AATGGAAC	GTTCCATT
7	G01	GCAGGTTC	AGAAGCAA	TTGCTTCT	31	G04	GCAACAAT	TCAGAGGT	ACCTCTGA
8	H01	AAGTGTCT	GCAGGTTC	GAACCTGC	32	H04	GTCGATCG	GCAACAAT	ATTGTTGC
9	A02	CTACCGAA	AAGTGTCT	AGACACTT	33	A05	ATGGTAGC	GTCGATCG	CGATCGAC
10	B02	TAGAGCTC	CTACCGAA	TTCCGTAG	34	B05	CGCCAATT	ATGGTAGC	GCTACCAT
11	C02	ATGTCAAG	TAGAGCTC	GAGCTCTA	35	C05	GACAATTG	CGCCAATT	AATTGGCG
12	D02	GCATCATA	ATGTCAAG	CTTGACAT	36	D05	ATATTCCG	GACAATTG	CAATTGTC
13	E02	GACTTGAC	GCATCATA	TATGATGC	37	E05	TCTACCTC	ATATTCCG	CGGAATAT
14	F02	CTACAATG	GACTTGAC	GTCAAGTC	38	F05	TCGTCTGT	TCTACCTC	GAGGTAGA
15	G02	TCTCAGCA	CTACAATG	CATTGTAG	39	G05	ATGAGAAC	TCGTCTGT	CACGACGA
16	H02	AGACACAC	TCTCAGCA	TGCTGAGA	40	H05	GTCCTATA	ATGAGAAC	GTTCTCAT
17	A03	CAGGTCTG	AGACACAC	GTGTGTCT	41	A06	AATGACCA	GTCCTATA	TATAGGAC
18	B03	AATACGCG	CAGGTCTG	CAGACCTG	42	B06	CAGACGCT	AATGACCA	TGGTCATT
19	C03	GCACACAT	AATACGCG	CGCGTATT	43	C06	TCGAACTG	CAGACGCT	AGCGTCTG
20	D03	CTTGATA	GCACACAT	ATGTGTGC	44	D06	CGCTTCCA	TCGAACTG	CAGTTCCA
21	E03	ATCCTCTT	CTTGATA	TATGCAAG	45	E06	TATCCTG	CGCTTCCA	TGGAAGCG
22	F03	GCACCTAA	ATCCTCTT	AAGAGGAT	46	F06	CAAGTTAC	TATCCTG	CAGGAATA
23	G03	TGCTGCTC	GCACCTAA	TTAGGTGC	47	G06	CAGAGCAG	CAAGTTAC	GTAACCTG
24	H03	TGGCACCA	TGCTGCTC	GAGCAGCA	48	H06	CGCGCAAT	CAGAGCAG	CTGCTCTG

8 リファレンス

表 111 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 49~96(オレンジ色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
49	A07	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	A10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACTAT
50	B07	ATGACGAA	TGAGGAGT	ACTCCTCA	74	B10	CAGTTGCG	AACGCATT	AATGCGTT
51	C07	TACGGCGA	ATGACGAA	TTGTCAT	75	C10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D07	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	E07	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTOGCT	77	E10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	F07	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	F10	AAGAACCT	GCAATGAA	TTCATTGC
55	G07	GACTIONAAT	GATCGCCT	AGGCGATC	79	G10	CTGTGCCT	AAGAACCT	AGTTCTT
56	H07	CAGCTTGC	GACTIONAAT	ATTGAGTC	80	H10	TACGTAGC	CTGTGCCT	AGGCACAG
57	A08	AGCTGAAG	CAGCTTGC	GCAAGCTG	81	A11	AAGTGGAC	TACGTAGC	GCTACGTA
58	B08	ATTCCGTG	AGCTGAAG	CTTCAGCT	82	B11	CAACCGTG	AAGTGGAC	GTCCACTT
59	C08	TATGCCGC	ATTCCGTG	CACGGAAT	83	C11	CTGTTGTT	CAACCGTG	CACGGTTG
60	D08	TCAGCTCA	TATGCCGC	GCGGCATA	84	D11	GCACGATG	CTGTTGTT	AACAACAG
61	E08	AACTGCAA	TCAGCTCA	TGAGCTGA	85	E11	GTACGGAC	GCACGATG	CATCGTGC
62	F08	ATTAGGAG	AACTGCAA	TTGCAGTT	86	F11	CTCCAAGC	GTACGGAC	GTCCGTAC
63	G08	CAGCAATA	ATTAGGAG	CTCCTAAT	87	G11	TAGTCTGA	CTCCAAGC	GCTTGGAG
64	H08	GCCAAGCT	CAGCAATA	TATTGCTG	88	H11	TTCGCCGT	TAGTCTGA	TCAGACTA
65	A09	TCCGTTAA	GCCAAGCT	AGCTTGGC	89	A12	GAACAAAG	ATACGAAG	CTTCGTAT
66	B09	GTGCAACG	TCCGTTAA	TTAACGGA	90	B12	AAGCCATC	GAGATTCA	TGAATCTC
67	C09	AGTAACGC	GTGCAACG	CGTTGCAC	91	C12	AACTCTTG	AAGCCATC	GATGGCTT
68	D09	CATAGCCA	AGTAACGC	GCGTACT	92	D12	GTAGTCAT	AACTCTTG	CAAGAGTT
69	E09	CACTAGTA	CATAGCCA	TGGCTATG	93	E12	CTCGCTAG	GTAGTCAT	ATGACTAC
70	F09	TTAGTGCG	CACTAGTA	TACTAGTG	94	F12	AGTCTTCA	CAGTATCA	TGATACTG
71	G09	TCGATACA	TTAGTGCG	CGCACTAA	95	G12	TCAAGCTA	CTTCGTAC	GTACGAAG
72	H09	ATAGTGAC	TCGATACA	TGTATCGA	96	H12	CTTATCCT	TCAAGCTA	TAGCTTGA

表 112 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 97~144(青いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
97	A01	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	A04	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	B01	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	B04	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	C01	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGTT	123	C04	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D01	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D04	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	E01	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAACT	125	E04	CGTCAAGA	CACACATA	TATGTGTG
102	F01	GCTACGCA	GTTGGTGT	ACACCAAC	126	F04	TTCGCGCA	CGTCAAGA	TCTTGACG
103	G01	TCAACTGC	GCTACGCA	TGCGTAGC	127	G04	CGACTACG	TTCGCGCA	TGCGCGAA
104	H01	AAGCGAAT	TCAACTGC	GCAGTTGA	128	H04	GAAGGTAT	CGACTACG	CGTAGTCG
105	A02	GTGTTACA	AAGCGAAT	ATTGCCTT	129	A05	TTGGCATG	GAAGGTAT	ATACCTTC
106	B02	CAAGCCAT	GTGTTACA	TGTAACAC	130	B05	CGAATTCA	TTGGCATG	CATGCCAA
107	C02	CTCTCGTG	CAAGCCAT	ATGGCTTG	131	C05	TTAGTTGC	CGAATTCA	TGAATTCG
108	D02	TCGACAAC	CTCTCGTG	CACGAGAG	132	D05	GATGCCAA	TTAGTTGC	GCAACTAA
109	E02	TCGATGTT	TCGACAAC	GTTGTGGA	133	E05	AGTTGCCG	GATGCCAA	TTGGCATC
110	F02	CAAGGAAG	TCGATGTT	AACATCGA	134	F05	GTCCACCT	AGTTGCCG	CGGCAACT
111	G02	ATTGATGC	AGAGAATC	GATTCTCT	135	G05	ATCAAGGT	GTCCACCT	AGGTGGAC
112	H02	TCGCAGAT	TTGATGGC	GCCATCAA	136	H05	GAACCAGA	ATCAAGGT	ACCTTGAT
113	A03	GCAGAGAC	TCGCAGAT	ATCTGCGA	137	A06	CATGTTCT	GAACCAGA	TCTGGTTC
114	B03	CTGCGAGA	GCAGAGAC	GTCTCTGC	138	B06	TCACTGTG	CATGTTCT	AGAACATG
115	C03	CAACCAAC	CTGCGAGA	TCTCGCAG	139	C06	ATTGAGCT	TCACTGTG	CACAGTGA
116	D03	ATCATGCG	CAACCAAC	GTTGGTTG	140	D06	GATAGAGA	ATTGAGCT	AGCTCAAT
117	E03	TCTGAGTC	ATCATGCG	CGCATGAT	141	E06	TCTAGAGC	GATAGAGA	TCTCTATC
118	F03	TCGCCTGT	TCTGAGTC	GACTCAGA	142	F06	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	G03	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCGA	143	G06	CTTACGCT	GAATCGCA	TGCGATTC
120	H03	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	H06	CTCCGGTT	CTTACGCT	ACGTGAAG

8 リファレンス

表 113 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 145~192(青いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
145	A07	TGTGACTA	CTCCGGTT	AACCGGAG	169	A10	CGCTCAGA	CTAACAAG	CTTGTTAG
146	B07	GCTTCCAG	TGTGACTA	TAGTCACA	170	B10	TAACGACA	CGCTCAGA	TCTGAGCG
147	C07	CATCCTGT	GCTTCCAG	CTGGAAGC	171	C10	CATACTTG	TAACGACA	TGTCGTTA
148	D07	GTAATACG	CATCCTGT	ACAGGATG	172	D10	AGATACGA	CATACTTG	CAAGTATG
149	E07	GCCAACAA	GTAATACG	CGTATTAC	173	E10	AATCCGAC	AGATACGA	TCGTATCT
150	F07	CATGACAC	GCCAACAA	TTGTTGGC	174	F10	TGAAGTAC	AATCCGAC	GTCGGATT
151	G07	TGCAATGC	CATGACAC	GTGTCATG	175	G10	CGAATCAT	TGAAGTAC	GTAATTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTCG
153	A08	CAATCCGA	CACATTCG	CGAATGTG	177	A11	TCGAAGGA	TGATTGGC	GCCAATCA
154	B08	CATCGACG	CAATCCGA	TCGATTGG	178	B11	CAGTCATT	TCGAAGGA	TCCTTCGA
155	C08	GTGCGCTT	CATCGACG	CGTCGATG	179	C11	CGCGAACA	CAGTCATT	AATGACTG
156	D08	ATAGCGTT	GTGCGCTT	AAGCGCAC	180	D11	TACGGTTG	CGCGAACA	TGTTCCGG
157	E08	GAGTAAGA	ATAGCGTT	AACGCTAT	181	E11	AGAACCGT	TACGGTTG	CAACCGTA
158	F08	CTGACACA	GAGTAAGA	TCTTACTC	182	F11	AGGTGCTT	AGAACCGT	ACGGTTCT
159	G08	ATACGTGT	CTGACACA	TGTGTCAG	183	G11	ATCGCAAC	AGGTGCTT	AAGCACCT
160	H08	GACCGAGT	ATACGTGT	ACACGTAT	184	H11	GCCTCTCA	ATCGCAAC	GTTGCGAT
161	A09	GCAGTTAG	GACCGAGT	ACTCGGTC	185	A12	TCGCGTCA	GCCTCTCA	TGAGAGGC
162	B09	CGTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	B12	GAGTGCCT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	C09	CGTTAACG	CGTTCGTC	GACGAACG	187	C12	CGAACACT	GCATAAGT	ACTTATGC
164	D09	TCGAGCAT	CGTTAACG	CGTTAACG	188	D12	TAAGAGTG	AGAAGACG	CGTCTTCT
165	E09	GCCGTAAC	TCGAGCAT	ATGCTCGA	189	E12	TGGATTGA	TAAGAGTG	CACTCTTA
166	F09	GAGCTGTA	GCCGTAAC	GTTACGGC	190	F12	AGGACATA	TGGATTGA	TCAATCCA
167	G09	AGGAAGAT	GAGCTGTA	TACAGCTC	191	G12	GACATCCT	AGGACATA	TATGTCCT
168	H09	CTAACAAG	AGGAAGAT	ATCTTCTC	192	H12	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

表 114 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 193~240(緑色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
193	A01	GTCTCTTC	GAAGCCTC	GAGGCTTC	217	A04	GCGGTATG	CACGAGCT	AGCTCGTG
194	B01	AGTCACTT	GTCTCTTC	GAAGAGAC	218	B04	TCTATGCG	GCGGTATG	CATACCGC
195	C01	AGCATACA	AGTCACTT	AAGTGACT	219	C04	AGGTGAGA	TCTATGCG	CGCATAGA
196	D01	TCAGACAA	AGCATACA	TGTATGCT	220	D04	CACAACCT	AGGTGAGA	TCTCACCT
197	E01	TTGGAGAA	TCAGACAA	TTGTCTGA	221	E04	TTGTGTAC	CACAACCT	AAGTTGTG
198	F01	TTAACGTG	TTGGAGAA	TTCTCCAA	222	F04	TCACAAGA	TTGTGTAC	GTACACAA
199	G01	CGTCTGTG	TTAACGTG	CACGTTAA	223	G04	GAAGACCT	TCACAAGA	TCTTGTGA
200	H01	AACCTAAC	CGTCTGTG	CACAGACG	224	H04	AGTTCTGT	GAAGACCT	AGGTCTTC
201	A02	AGAGTGCT	AACCTAAC	GTTAGGTT	225	A05	GCAGTGTT	AGTTCTGT	ACAGAACT
202	B02	TTATCTCG	AGAGTGCT	AGCACTCT	226	B05	AGGCATGC	GCAGTGTT	AACACTGC
203	C02	CATCAGTC	TTATCTCG	CGAGATAA	227	C05	AAGGTAAT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GAAGTATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTAAT	AGTACCTT
205	E02	CAGTGAGC	AAGCACAA	TTGTGCTT	229	E05	GAGTCCTA	CACTAAGT	ACTTAGTG
206	F02	GTCGAAGT	CAGTGAGC	GCTCACTG	230	F05	AGTCCTTC	GAGTCCTA	TAGGACTC
207	G02	TCTCATGC	GTCGAAGT	ACTTCGAC	231	G05	TTAGGAAC	AGTCCTTC	GAAGGACT
208	H02	CAGAAGAA	TCTCATGC	GCATGAGA	232	H05	AAGTCCAT	TTAGGAAC	GTTCCCTA
209	A03	CGGATAGT	CAGAAGAA	TTCTTCTG	233	A06	GAATACGC	AAGTCCAT	ATGGACTT
210	B03	CACGTGAG	CGGATAGT	ACTATCCG	234	B06	TCCAATCA	GAATACGC	GCGTATTC
211	C03	TACGATAC	CACGTGAG	CTCACGTG	235	C06	CGACGGTA	TCCAATCA	TGATTGGA
212	D03	CGCATGCT	TACGATAC	GTATCGTA	236	D06	CATTGCAT	CGACGGTA	TACCGTCG
213	E03	GCTTGCTA	CGCATGCT	AGCATGCG	237	E06	ATCTGCGT	CATTGCAT	ATGCAATG
214	F03	GAACGCAA	GCTTGCTA	TAGCAAGC	238	F06	GTACCTTG	ATCTGCGT	ACGCAGAT
215	G03	ATCTACCA	GAACGCAA	TTGCGTTC	239	G06	GAGCATAC	GTACCTTG	CAAGGTAC
216	H03	CACGAGCT	ATCTACCA	TGGTAGAT	240	H06	TGCTTACG	GAGCATAC	GTATGCTC

8 リファレンス

表 115 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 241~288(緑色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
241	A07	AAGAGACA	TGCTTACG	CGTAAGCA	265	A10	CAATGCTG	CATGAATG	CATTCATG
242	B07	TAGCTATG	AAGAGACA	TGTCTCTT	266	B10	CTTGATCA	CAATGCTG	CAGCATTG
243	C07	TCTGCTAC	TAGCTATG	CATAGCTA	267	C10	GCGAATTA	CTTGATCA	TGATCAAG
244	D07	GTCACAGA	TCTGCTAC	GTAGCAGA	268	D10	GTTCGAGC	GCGAATTA	TAATTCGC
245	E07	CGATTGAA	GTCACAGA	TCTGTGAC	269	E10	GCCAGTAG	GTTCGAGC	GCTCGAAC
246	F07	GAGAGATT	CGATTGAA	TTCAATCG	270	F10	AAGGTCEGA	GCCAGTAG	CTACTGGC
247	G07	TCATACCG	GAGAGATT	AATCTCTC	271	G10	AGTGAAGT	CACTTATG	CATAAGTG
248	H07	TCCGAACT	TCATACCG	CGGTATGA	272	H10	GTTGCAAG	ATAACGGC	GCCGTTAT
249	A08	AGAGAGAA	TCCGAACT	AGTTCGGA	273	A11	AGCCGGAA	GTTGCAAG	CTTGCAAC
250	B08	GATCGTTA	AGAGAGAA	TTCTCTCT	274	B11	AACAGCCG	AGCCGGAA	TTCCGGCT
251	C08	GCGCTAGA	GATCGTTA	TAACGATC	275	C11	CTAGTGTA	AACAGCCG	CGGCTGTT
252	D08	ATGACTCG	GCGCTAGA	TCTAGCGC	276	D11	GAGGCTCT	CTAGTGTA	TACACTAG
253	E08	CAATAGAC	ATGACTCG	CGAGTCAT	277	E11	CTCCGCAA	GAGGCTCT	AGAGCCTC
254	F08	CGATATGC	CAATAGAC	GTCTATTG	278	F11	CGCTATTG	CTCCGCAA	TTGCGGAG
255	G08	GTCAGAAT	CGATATGC	GCATATCG	279	G11	GTGTTGAG	CGCTATTG	CAATAGCG
256	H08	CATAAGGT	GCACTACT	AGTAGTGC	280	H11	TCACCGAC	GTGTTGAG	CTCAACAC
257	A09	TGTTGGTT	GATTCGGC	GCCGAATC	281	A12	CGGTAATC	TCACCGAC	GTCGGTGA
258	B09	ATACTCGC	TGTTGGTT	AACCAACA	282	B12	GTGACTGC	CGGTAATC	GATTACCG
259	C09	AATGCTAG	ATACTCGC	GCGAGTAT	283	C12	CGACTTGT	GTGACTGC	GCAGTCAC
260	D09	GCCTAGGA	AATGCTAG	CTAGCATT	284	D12	GATAGGAC	CGACTTGT	ACAAGTCG
261	E09	GCAACCGA	GCCTAGGA	TCCTAGGC	285	E12	AAGTACTC	GATAGGAC	GTCCTATC
262	F09	ATACTGCA	GCAACCGA	TCGTTTGC	286	F12	GCTCTCTC	AAGTACTC	GAGTACTT
263	G09	TCTCCTTG	ATACTGCA	TGCAGTAT	287	G12	CTACCAGT	GCTCTCTC	GAGAGAGC
264	H09	CATGAATG	TCTCCTTG	CAAGGAGA	288	H12	GATGAGAT	CTACCAGT	ACTGGTAG

表 116 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 289~336 (赤いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
289	A01	AGATAGTG	GATGAGAT	ATCTCATC	313	A04	AGCTACAT	GATCCATG	CATGGATC
290	B01	AGAGGTTA	AGATAGTG	CACTATCT	314	B04	CGCTGTAA	AGCTACAT	ATGTAGCT
291	C01	CTGACCGT	AGAGGTTA	TAACCTCT	315	C04	CACTACCG	CGCTGTAA	TTACAGCG
292	D01	GCATGGAG	CTGACCGT	ACGGTCAG	316	D04	GCTCACGA	CACTACCG	CGGTAGTG
293	E01	CTGCCTTA	GCATGGAG	CTCCATGC	317	E04	TGGCTTAG	GCTCACGA	TCGTGAGC
294	F01	GCGTCACT	CTGCCTTA	TAAGGCAG	318	F04	TCCAGACG	TGGCTTAG	CTAAGCCA
295	G01	GCGATTAC	GCGTCACT	AGTGACGC	319	G04	AGTGGCAT	TCCAGACG	CGTCTGGA
296	H01	TCACCACG	GCGATTAC	GTAATCGC	320	H04	TGTACCGA	AGTGGCAT	ATGCCACT
297	A02	AGACCTGA	TCACCACG	CGTGGTGA	321	A05	AAGACTAC	TGTACCGA	TCGGTACA
298	B02	GCCGATAT	AGACCTGA	TCAGGTCT	322	B05	TGCCGTTA	AAGACTAC	GTAGTCTT
299	C02	CTTATTGC	GCCGATAT	ATATCGGC	323	C05	TTGGATCT	TGCCGTTA	TAACGGCA
300	D02	CGATACCT	CTTATTGC	GCAATAAG	324	D05	TCCTCAA	TTGGATCT	AGATCCAA
301	E02	CTCGACAT	CGATACCT	AGGTATCG	325	E05	CGAGTCGA	TCCTCAA	TTGGAGGA
302	F02	GAGATCGC	CTCGACAT	ATGTCGAG	326	F05	AGGTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAACAC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAACAC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GACTGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GACTGACG	CGTCAGTC	331	C06	AACTACA	TGGAGACT	AGTCTCCA
308	D03	GAGTGTAG	CTTAAGAC	GTCTTAAG	332	D06	GTAGACTG	AACTACA	TGTGAGTT
309	E03	TGCACATC	GAGTGTAG	CTACACTC	333	E06	CGTAGTTA	GTAGACTG	CAGTCTAC
310	F03	CGATGTCG	TGCACATC	GATGTGCA	334	F06	CGTCAGAT	CGTAGTTA	TAACACG
311	G03	AACACCGA	CGATGTCG	CGACATCG	335	G06	AACGGTCA	CGTCAGAT	ATCTGACG
312	H03	GATCCATG	AACACCGA	TCGGTGTT	336	H06	GCCTTCAT	AACGGTCA	TGACCGTT

8 リファレンス

表 117 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 337~384(赤いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
337	A07	TGAGACGC	GCCTTCAT	ATGAAGGC	361	A10	CTGAGCTA	GCACAGTA	TACTGTGC
338	B07	CATCGGAA	TGAGACGC	GCGTCTCA	362	B10	CTTGCGAT	CTGAGCTA	TAGCTCAG
339	C07	TAGGACAT	CATCGGAA	TTCCGATG	363	C10	GAAGTAGT	CTTGCGAT	ATCGCAAG
340	D07	AACACAAG	TAGGACAT	ATGTCCTA	364	D10	GTTATCGA	GAAGTAGT	ACTACTTC
341	E07	TTCGACTC	AACACAAG	CTTGTGTT	365	E10	TGTCGTCG	GTTATCGA	TCGATAAC
342	F07	GTCGGTAA	TTCGACTC	GAGTCGAA	366	F10	CGTAACTG	TGTCGTCG	CGACGACA
343	G07	GTTCATTG	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCATTG	GAATGAAC	368	H10	TCGTACAC	GCATGCCT	AGGCATGC
345	A08	ATAAGCTG	AAGCAGTT	AACTGCTT	369	A11	CACAGGTG	TCGTACAC	GTGTACGA
346	B08	GCTTAGCG	ATAAGCTG	CAGCTTAT	370	B11	AGCAGTGA	CACAGGTG	CACCTGTG
347	C08	TTCCAACA	GCTTAGCG	CGCTAAGC	371	C11	ATTCCAGA	AGCAGTGA	TCACTGCT
348	D08	TACCGCAT	TTCCAACA	TGTTGGAA	372	D11	TCCTTGAG	ATTCCAGA	TCTGGAAT
349	E08	AGGCAATG	TACCGCAT	ATGCGGTA	373	E11	ATACTAC	TCCTTGAG	CTCAAGGA
350	F08	GCCTCGTT	AGGCAATG	CATTGCCT	374	F11	AGACCATT	ATACTAC	GTAGGTAT
351	G08	CACGGATC	GCCTCGTT	AACGAGGC	375	G11	CGTAAGCA	AGACCATT	AATGGTCT
352	H08	GAGACACG	CACGGATC	GATCCGTG	376	H11	TCTGTCAG	CGTAAGCA	TGCTTACG
353	A09	AGAGTAAG	GAGACACG	CGTGTCTC	377	A12	CACAGACT	TCTGTCAG	CTGACAGA
354	B09	AGTACGTT	AGAGTAAG	CTTACTCT	378	B12	GTCGCCTA	CACAGACT	AGTCTGTG
355	C09	AACGCTGC	AGTACGTT	AACGTAAT	379	C12	TGCGCTCT	GTCGCCTA	TAGGCGAC
356	D09	GTAGAGCA	AACGCTGC	GCAGCGTT	380	D12	GCTATAAG	TGCGCTCT	AGAGCGCA
357	E09	TCCTGAGA	GTAGAGCA	TGCTCTAC	381	E12	CAACAAT	GCTATAAG	CTTATAGC
358	F09	CTGAATAG	TCCTGAGA	TCTCAGGA	382	F12	AGAGAATC	CTCTCACT	AGTGAGAG
359	G09	CAAGACTA	CTGAATAG	CTATTGAG	383	G12	TAATGGTC	AGACGAGC	GCTCGTCT
360	H09	GCACAGTA	CAAGACTA	TAGTCTTG	384	H12	GTTGTATC	TAATGGTC	GACCATTA

インデックスプライマーペアのプレートマップ

表 118 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1~96(オレンジ色のプレート)のプレートマップ

	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

表 119 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97~192(青いプレート)のプレートマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	1110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

8 リファレンス

表 120 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193~288(緑色のプレート)のプレートマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
B	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
C	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
D	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
E	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
F	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286
G	199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279	287
H	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288

表 121 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289~384(赤いプレート)のプレートマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
B	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
C	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
D	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
E	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
F	294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374	382
G	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375	383
H	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376	384

クイックリファレンス: マスターミックスとソースプレートの液量

このセクションでは SureSelect XT HS2 DNA 自動化プロトコルで使用するマスターミックスの計算とソースプレートの液量に関する表をまとめて再掲載しています。

酵素法による断片化

表 122 Fragmentation マスターミックス (48 ページ)

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	97.8 µL	136.0 µL	253.8 µL
5X SureSelect Fragmentation Buffer (blue cap)	2 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	97.8 µL	136.0 µL	253.8 µL
SureSelect Fragmentation Enzyme (green cap)	1 µL	21.3 µL	29.8 µL	38.3 µL	48.9 µL	68.0 µL	126.9 µL
Total Volume	5 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	244.5 µL	340.0 µL	634.5 µL

表 123 EnzFrag_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレート (49 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Fragmentation master mix	Column 1 (A1-H1)	12.5 µL	17.5 µL	22.5 µL	28.8 µL	40.0 µL	75.0 µL

ライブラリ調製

表 124 末端修復/dA 付加マスターミックス (57 ページ)

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
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	16 µL	204 µL	340 µL	476 µL	612 µL	884 µL	1836 µL
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µL	51 µL	85 µL	119 µL	153 µL	221 µL	459 µL
Total Volume	20 µL	255 µL	425 µL	595 µL	765 µL	1105 µL	2295 µL

表 125 ライゲーションマスターミックス (58 ページ)

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 Buffer (purple cap or bottle)	23 µL	293.3 µL	488.8 µL	684.3 µL	879.8 µL	1270.8 µL	2737 µL
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	110.5 µL	238 µL
Total Volume	25 µL	318.8 µL	531.3 µL	743.8 µL	956.3 µL	1381.3 µL	2975 µL

8 リファレンス

表 126 Adaptor Oligo Mix 希釈液 (58 ページ)

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µL	42.5 µL	63.8 µL	85.0 µL	106.3 µL	143.5 µL	276.3 µL
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix (white cap)	5 µL	85.0 µL	127.5 µL	170.0 µL	212.5 µL	287.0 µL	552.5 µL
Total Volume	7.5 µL	127.5 µL	191.3 µL	255.0 µL	318.8 µL	430.5 µL	828.8 µL

表 127 LibraryPrep_XT_HS2_ILM runset 用マスターミックスソースプレート (59 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Agilent Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
End Repair-dA Tailing master mix	Column 1 (A1-H1)	31.0 µL	52.0 µL	73.0 µL	94.0 µL	136.0 µL	280.0 µL
Ligation master mix	Column 2 (A2-H2)	36.0 µL	62.0 µL	88.0 µL	114.0 µL	166.0 µL	360.0 µL
Adaptor Oligo Mix dilution	Column 3 (A3-H3)	15.0 µL	22.5 µL	30.0 µL	37.5 µL	52.5 µL	101.3 µL

プレキャプチャ PCR

表 128 キャプチャ前 PCR マスターミックス (64 ページ)

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 Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340 µL	425 µL	574 µL	1066 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17 µL	25.5 µL	34 µL	42.5 µL	57.4 µL	106.6 µL
Total Volume	11 µL	187 µL	280.5 µL	374 µL	467.5 µL	631.4 µL	1172.6 µL

表 129 Pre-CapPCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレート (64 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Pre-Capture PCR Master Mix	Column 2 (A2-H2)	22 µL	33 µL	44 µL	55 µL	77 µL	143 µL

ハイブリダイゼーション

表 130 Block マスターミックス (94 ページ)

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 8 Columns
Nuclease-free water	2.5 µL	31.9 µL	53.1 µL	74.4 µL	95.6 µL	138.1 µL	276.3 µL
SureSelect XT HS2 Blocker Mix (blue cap)	5.0 µL	63.8 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	276.3 µL	552.5 µL
Total Volume	7.5 µL	95.7 µL	159.4 µL	223.2 µL	286.9 µL	414.4 µL	828.8 µL

表 131 ターゲットサイズ **3 Mb 未満** のキャプチャライブラリの場合の Probe Hybridization Mix (95 ページ)

Target size <3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	7.0 µL	89.3 µL	148.8 µL	208.3 µL	267.8 µL	401.6 µL	818.1 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	6.4 µL	10.6 µL	14.9 µL	19.1 µL	28.7 µL	58.4 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	76.5 µL	127.5 µL	178.5 µL	229.5 µL	344.3 µL	701.3 µL
Probe (with design <3.0 Mb)	2.0 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	114.8 µL	233.8 µL
Total Volume	15.5 µL	197.7 µL	329.4 µL	461.2 µL	592.9 µL	889.4 µL	1811.6 µL

表 132 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のキャプチャライブラリの場合の Probe Hybridization Mix (95 ページ)

Target size ≥3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	4.0 µL	51.0 µL	85.0 µL	119.0 µL	153.0 µL	229.5 µL	467.5 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	6.4 µL	10.6 µL	14.9 µL	19.1 µL	28.7 µL	58.4 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	76.5 µL	127.5 µL	178.5 µL	229.5 µL	344.5 µL	701.3 µL
Probe (with design ≥3 Mb)	5.0 µL	63.8 µL	106.3 µL	148.8 µL	191.3 µL	286.9 µL	584.4 µL
Total Volume	15.5 µL	197.7 µL	329.4 µL	461.2 µL	592.9 µL	889.4 µL	1811.6 µL

表 133 ターゲットサイズ **3 Mb 未満** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分 (95 ページ)

Target size <3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	7 µL	10.5 µL	17.5 µL	24.5 µL	31.5 µL	49.0 µL	98.0 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	0.8 µL	1.3 µL	1.8 µL	2.3 µL	3.5 µL	7.0 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	9.0 µL	15.0 µL	21.0 µL	27.0 µL	42.0 µL	84.0 µL
Probe (with design <3.0 Mb)	2.0 µL	3.0 µL	5.0 µL	7.0 µL	9.0 µL	14.0 µL	28.0 µL
Total Volume	15.5 µL	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL

8 リファレンス

表 134 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分 (96 ページ)

Target size ≥3.0 Mb							
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	4.0 µL	6.0 µL	10.0 µL	14.0 µL	18.0 µL	28.0 µL	56.0 µL
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	0.8 µL	1.3 µL	1.8 µL	2.3 µL	3.5 µL	7.0 µL
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µL	9.0 µL	15.0 µL	21.0 µL	27.0 µL	42.0 µL	84.0 µL
Probe (with design ≥3 Mb)	5.0 µL	7.5 µL	12.5 µL	17.5 µL	22.5 µL	35.0 µL	70.0 µL
Total Volume	15.5 µL	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL

表 135 Hyb_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレート (96 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Block master mix	Column 1 (A1-H1)	11.0 µL	19.0 µL	27.0 µL	34.9 µL	50.9 µL	102.7 µL
Probe Hybridization master mix	Column 2 (A2-H2)	23.3 µL	38.8 µL	54.3 µL	69.8 µL	108.5 µL	217.0 µL*

* The maximum well volume for an Eppendorf twin.tec plate is 250 µL. Wells containing 217.0 µL will be nearly full.

ハイブリキャプチャと洗浄

表 136 磁気ビーズ洗浄混合液 (101 ページ)

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
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 bead suspension	50 µL	425 µL	825 µL	1225 µL	1.65 mL	2.5 mL	5.0 mL
SureSelect Binding Buffer	0.2 mL	1.7 mL	3.3 mL	4.9 mL	6.6 mL	10 mL	20 mL
Total Volume	0.25 mL	2.125 mL	4.125 mL	6.125 mL	8.25 mL	12.5 mL	25 mL

表 137 磁気ビーズの再懸濁 (102 ページ)

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
SureSelect Binding Buffer	0.2 mL	1.7 mL	3.3 mL	4.9 mL	6.6 mL	10 mL	20 mL

ポストキャプチャ PCR

表 138 キャプチャ後 PCR マスターミックス (108 ページ)

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
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340 µL	425 µL	574 µL	1105 µL
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 µL	17.0 µL	25.5 µL	34.0 µL	42.5 µL	57.4 µL	110.5 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17.0 µL	25.5 µL	34.0 µL	42.5 µL	57.4 µL	110.5 µL
Total Volume	12.0 µL	204.0 µL	306.0 µL	408.0 µL	510.0 µL	688.8 µL	1326.0 µL

表 139 Post-CapPCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレート (109 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Post-Capture PCR Master Mix	Column 3 (A3-H3)	23.0 µL	36.0 µL	49.0 µL	62.0 µL	82.0 µL	163.0 µL

クイックリファレンス: その他の試薬の容量

このセクションでは gDNA インプット量と、XT HS2 インデックスプライマーの液量、および自動化プロトコルで使用するリザーバーに入れる Nuclease-free Water, 70%エタノール、AMPure XP ビーズの液量をまとめて掲載しています。

表 140 gDNA インプット量

Genomic DNA Input (100–200 ng)	Volume for 1 Library
Enzymatic fragmentation	15 μ L
Mechanical shearing	50 μ L

表 141 XT HS2 プライマープレート上のインデックスプライマーペアの液量

Reagent	Volume for 1 Library
XT HS2 Index Primer Pairs	5 μ L

表 142 AMPure XP Protocols で使用する AMPure XP Beads の液量

Protocol or Runset	Volume of AMPure Beads per Well*
LibraryPrep_XT_HS2_ILM	80 μ L
AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR - SinglePlex)	50 μ L
AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Cap PCR - MultiPlex)	50 μ L
AMPureXP_XT_HS2_ILM (Concentration of Pool)	180 μ L
AMPureXP_XT_HS2_ILM (Post-Capture PCR)	50 μ L

* When preparing the plates of AMPure XP beads, fill the columns of the reservoir with enough of the bead suspension to cover the pyramid-shaped wells

表 143 AMPure XP Protocols で使用する水とエタノールの液量

Reagent	Volume per Reservoir
70% ethanol in Agilent deep well reservoir	50 mL
Nuclease-free water in Agilent shallow well reservoir	30 mL

トラブルシュートガイド

サンプルから DNA 精製する時に DNA の収量が少ない

- ✓ gDNA の精製の際、サンプルを過剰に加えると収量が低くなる場合があります。gDNA 精製プロトコルでの、各組織種の推奨量に従って調製してください。
- ✓ 組織サンプルの溶解が gDNA 精製の間最適な条件でなされていない可能性があります。56°Cでの Proteinase K による分解反応中、20~30 分ごとに分解反応溶液を静かにピペティングしながら、溶液中の組織の塊の存在を確認しながらサンプルの溶解の状況を調べます。もし 56°C 1 時間のインキュベーション後にも組織の塊が存在する場合、Proteinase K 10 μ L をさらに追加し定期的な攪拌を行い溶解の状況を確認しながら、56°Cのインキュベーションを続けます（追加分、2 時間まで）。サンプル中に組織の塊が見られなくなりましたら、サンプルを室温にうつし、その他のサンプルの溶解がおわるまで室温においておきます。ただし、過剰な分解反応は避けてください。室温に戻した後、各サンプルは、2 時間以内にプロトコルの次のステップに進んでください。また、56°Cのインキュベーションを 3 時間以上行わないでください。

キャプチャ前のライブラリの収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペティング・混合の特異的な説明が記載されております。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ PCR サイクル数は最適化が必要な場合があります。再度、そのサンプルについてはキャプチャ前 PCR 反応のサイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製を試してください。ただし、収量の低いサンプルについて、電気泳動図 (electropherogram) 中に高分子量のピーク (>500 bp) が確認される場合、その DNA は増幅過多である可能性が示唆されます。そのサンプルについては、キャプチャ前 PCR のサイクル数を 1~3 サイクル減らしてください。
- ✓ FFPE 組織サンプルを含む、分解しているサンプルから調製した DNA は、過度に分解している場合や、ライブラリ調製を阻害するような修飾をうけている場合があります。Agilent NGS FFPE QC Kit を使用して、サンプル中の増幅可能な DNA の量を精密に測定してインプットする DNA の量を調整してください。
- ✓ 固層可逆固定法 (SPRI) による精製ステップに不具合がある可能性があります。精製に用いている AMPure XP ビーズの使用期限をご確認ください。ビーズの保存や操作の条件は、製造元推奨の内容に従ってください。使用前は必ず 30 分以上室温においてください。SPRI の操作では、新しく調製した 70 %エタノールを使用してください。

End Repair-A Tailing Buffer 中に固形物が確認される

- ✓ 溶液を高速のボルテックスミキサにて混合し、固形物を溶解してください。始めに溶解したときに固形物があっても性能には影響しませんが、その後よく混合して固形物を溶解してからお使いください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より長い

- ✓ 断片化の条件が最適ではない可能性があります。分解していない高品質の DNA については、必ずプロトコルに記載されているとおり、遠心・ボルテックスミキサ含めて 2 段階で断片化を実施してください。
- ✓ microTUBE フィラメント中に泡が入っていると断片化が不完全になることがあります。最初の断片

8 リファレンス

化工程の前に必ず microTUBE を 30 秒遠心して、泡が入っていないことを確認してください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定と異なる

- ✓ FFPE DNA のキャプチャ前のライブラリには、インプット DNA 中のターゲット断片長より短い DNA の影響により、短いサイズのものが含まれることがあります。
- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。ビーズプレートを準備するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合してから、shallow well reservoir に注いでください。ビーズプレートの準備が完了したら、シールをして使用するまで 4°C で保管してください。

得られたキャプチャ前ライブラリの QC で低分子量のアダプターダイマーピークが検出される

- ✓ 想定されるピーク以外に、低分子量のピークがあることは、ライブラリ中にアダプターダイマーが存在している可能性を示唆しています。75 ページの図 10 と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、次のターゲットエンリッチのステップに進んでも問題ありません。それ以上にアダプターダイマーが含まれている場合は、キャプチャ前のライブラリの収量を低下させる可能性があります。アダプターダイマーが多く存在する場合は、アダプターライゲーションの工程が 27 ページに記載されている内容で実施されているかどうか確認してください。特に、Ligation Master Mix をサンプルと混合してから、その後 Adaptor Oligo Mix を混合する点に注意してください。Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix を同時にサンプルに入れてはいけません。
- ✓ 全ゲノムシーケンス(本プロトコルを含めサポート外)のためには、アダプターダイマーピークが存在するサンプルは、追加で SPRI 精製の実施を推奨します。その際は、サンプルを Nuclease-free water で 50 µL に希釈して、AMPureXP_XT_HS2_ILM (Pre-Capture PCR) プロトコルを行ってください。

キャプチャ後ライブラリの収量が低い

- ✓ PCR のサイクル数の最適化が必要な場合があります。キャプチャ後 PCR サイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製とターゲットエンリッチを再度実施してください。
- ✓ ハイブリダイゼーションに使用した RNA プローブに要因がある可能性があります。使用したキャプチャプローブのチューブや Certificate of Analysis に記載されている使用期限を確認してください。保存および取り扱いについては、推奨される内容に従ってください。Probe Hybridization Mix は、95 ページの内容にて、使用する直前に調製してください。また、キャプチャライブラリを含む溶液は長時間室温に置かないでください。

得られたキャプチャ後ライブラリの断片長が想定と異なる

- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。ビーズプレートを準備するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合してから、shallow well reservoir に注いでください。ビーズプレートの準備が完了したら、シールをして使用するまで 4°C で保管してください。

シーケンスの結果で on-target%が低い

- ✓ ハイブリダイゼーションの際、ハイブリダイゼーション反応液を室温に晒す時間を最小にしてください。サーマルサイクラに戻すステップ (100 ページのステップ 26) でサンプルの温度を 65°C に保てるように、サーマルサイクラは、極力 NGS 自動化システムの近くにおいてください。

シーケンスの結果で AT-ドロップアウトが高く uniformity of coverage が低い

- ✓ AT-ドロップアウトが高いことは、ハイブリダイゼーションの条件が厳し過ぎて、AT-rich なターゲットを求められるカバレッジレベルが得られなかったことが考えられます。
 - ・ SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8 プローブを使用し、92 ページ表 63 のハイブリダイゼーションプログラム(65°C 1 時間のインキュベーションを含む)でターゲットエンリッチしたライブラリは、93 ページ表 64 のハイブリダイゼーションプログラム(65°C 1 時間のインキュベーションを含まない)でターゲットエンリッチメントを行ってください。
 - ・ 他のキャプチャプローブは、ハイブリダイゼーションでのサーマルサイクラプログラムについて、Segment 4 と 5 のハイブリ温度を 65°C から 62.5°C もしくは 60°C に下げて(93 ページ表 64 参照)、再度低い stringency の条件でハイブリダイゼーションを行います。

G230505

SureSelect 製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120 - 477 - 111

Mail: email_japan@agilent.com

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く
9:00～12:00、13:00～17:00

※ SureSelect のプロトコル名とともに、テクニカルな質問と明示してください。

※ 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。