



アジレント

SureSelect XT HS2 mRNAライブラリ調製システム

Bravo NGS 自動化システム Option B 対応

Poly-A 選択およびStrand-Specific RNA ライブラリ調製

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 [2023 年 1 月版 和文]

Version A1 対応

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2022

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。

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 表示の箇所は、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。正しく実行または遵守されなかった場合に、事故や重大な怪我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。WARNING 表示の箇所は、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。

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。

限定使用ラベルライセンス:本製品とその使用は、New England Biolabs, Inc.に独占的にライセンスされ、Agilent Technologies にサブライセンスされた、Max Planck Gesellschaft が所有する 1 つ以上の発行済みおよび/または保留中の米国および外国の特許出願の対象です。Agilent Technologies, Inc.、その関連会社またはそれらの正規の販売店もしくは再販業者からの本製品の購入により、ご購入頂いた量の本製品および本製品の成分を購入者(購入者が学術団体であるか営利団体であるかを問わない)が実施する研究において使用する譲渡不可能な権利が購入者には与えられます。本製品の購入は、本製品の製造を目的とした前述の特許または特許出願のクレームに基づくライセンスを付与するものではありません。購入者は、本製品またはその成分を第三者に販売またはその他の方法で譲渡したり、次の商業目的で本製品を使用したりすることはできません。(1)製造において本製品またはその成分を使用すること、または(2)ヒトまたは動物における治療または予防目的で本製品またはその成分を使用すること。

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 mRNA Library Preparation System Automated using Agilent NGS Workstation
Option B Poly-A Selection and Strand-Specific mRNA Seq Library Preparation for the Illumina
Platform Version A1, December 2022 [G9995-90010] に対応しています。

このプロトコルでは、SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キットを用い、Total RNA サンプルから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 mRNA (whole-transcriptome)シーケンス用のライブラリを調製するために開発・最適化されています。

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 ライブラリ調製

この章では、Agilent Bravo NGS 自動化システムの紹介、SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製のワークフローの概要、および Agilent Bravo NGS 自動化システムを用いて SureSelect の実験をデザインする際に注意すべきポイントについて説明しています。

3 Total RNA の準備と品質評価

この章では、RNA の品質確認と、RNA サンプルの調製について説明しています。

4 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します。

5 Poly-A 選択と cDNA 変換

この章では、mRNA エンリッチメントと RNA の断片化を含むインプット RNA サンプルの準備と、シーケンスライブラリ調製に先立ち RNA 断片をストランド特異性のある cDNA へ変換するステップを説明します。

6. ライブラリ調製

この章では、イルミナペアリードプラットフォームを用いたシーケンスのための cDNA NGS ライブラリの自動調製の手順について説明しています。

7 マルチプレックスシーケンスガイドライン

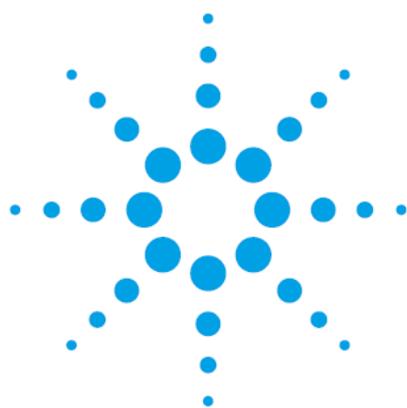
この章では、インデックスおよび分子バーコード付加がされたサンプルをプールする手順と、マルチプレックスシーケンスのガイドラインについて説明しています。

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.....	8
操作に関する注意	9
安全に関する注意	10
実験に必要な試薬・装置・消耗品類.....	11
2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect ライブラリ調製	14
Agilent Bravo NGS 自動化システム	15
Bravo プラットフォームについて	16
VWorks Automation Control ソフトウェア	21
ワークフローの概要	27
ワークフローで使用される自動化プロトコル.....	28
自動化ランを行う上での実験条件の検討.....	29
自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる cDNA サンプルの位置	29
装置の設置について.....	30
PCR プレーートの選択.....	30
3 Total RNA の準備と品質評価	31
Step 1. Total RNA の準備と品質の評価	32
Step 2. Total RNA サンプルプレートの準備	33
4 AMPure XP Bead Plates の準備.....	34
Step 1. Second-strand cDNA 合成用ビーズプレートの準備	35
AMPureXP_Aliquot (Second-Strand) 用ワークステーションと試薬の準備	35
Bravo デッキのセットアップ	35
AMPureXP_Aliquot (Second-Strand) の実行.....	36
Step 2. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備.....	37
AMPureXP_Aliquot (Library Prep)プロトコルの実行	37
AMPureXP_Aliquot (Low Input or Quality) プロトコル(必要に応じて実施)	39
Step 3. PCR 精製用ビーズプレートの準備.....	42
AMPureXP_Aliquot (PCR) 用ワークステーションと試薬の準備	42
Bravo デッキのセットアップ	42
AMPureXP_Aliquot (PCR) の実行.....	43
5 Poly-A 選択と cDNA 変換	44
Step 1. Total RNA からの poly-A 選択.....	45
Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA 用ワークステーションの準備	45
試薬プレートの準備	45
Water reservoir の準備	46
ワークステーションの準備	46
Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA の実行.....	47
Step 2. mRNA サンプルの断片化	49
Fragmentation_XT_HS2_mRNA の準備	49
サーマルサイクラの準備	49
Fragmentation マスターミックスソースプレートの調製	50
ワークステーションへのセット	51
Fragmentation_XT_HS2_mRNA の実行	52
Step 3. First strand cDNA の合成	54
FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA の準備	54
First strand cDNA 合成用サーマルサイクラの準備	54
First strand cDNA マスターミックスソースプレートの調製	54
ワークステーションへのセット	56

FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA の実行.....	57
Step 4. Second strand cDNA 合成と精製.....	59
SecondStrand_XT_HS2_RNA 用ワークステーションの準備.....	59
Second strand cDNA マスターミックスソースプレートの調製.....	59
Second strand 合成用試薬の準備.....	60
ワークステーションへのセット.....	61
SecondStrand_XT_HS2_RNA の実行.....	62
6. ライブラリ調製.....	64
Step 1. アダプター付加ライブラリの調製.....	65
ワークステーションの準備.....	66
末端修復/dA 付加マスターミックスの調製.....	66
ライゲーションマスターミックスの調製.....	67
Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製.....	67
マスターミックスソースプレートの調製.....	68
精製用試薬の準備.....	69
ワークステーションへのセット.....	69
LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM の実行.....	71
Step 2. アダプター付加ライブラリの増幅.....	72
ワークステーションの準備.....	72
サーマルサイクラの準備.....	73
SureSelect XT HS2Index Primer Pair の準備.....	73
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.....	74
ワークステーションへのセット.....	75
PCR_XT_HS2_ILM の実行.....	76
Step 3. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製.....	78
ワークステーションと試薬の準備.....	78
AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR) の実行.....	80
Step 4. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認.....	81
Option1: Agilent 4200 TapeStation と D1000 アッセイを使用する場合.....	81
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).....	85
7 マルチプレックスシーケンスガイドライン.....	86
Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional).....	87
Step 2. シーケンスサンプルの調製.....	91
Step 3. シーケンスの開始とデータ解析.....	93
データ解析リソース.....	97
8 リファレンス.....	99
キットの内容.....	100
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報.....	102
インデックスプライマーペアのプレートマップ.....	111
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.....	113
クイックリファレンス: その他の試薬の容量.....	116
トラブルシュートガイド.....	117



1 はじめに

操作に関する注意	9
安全に関する注意	10
実験に必要な試薬・装置・消耗品類	11

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。SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット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 (G9995-90010 またはその和訳版) を参照ください。

NOTE

SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キットを本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となりますのでご了承ください。

NOTE

本 SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キットにつきましては、誤った使用方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℃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℃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際には、いつも 46 ページの図 3 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 mRNA プロトコルに必要な試薬や器具を表にまとめています。

表 1 から SureSelect XT HS2 mRNA 試薬キットを選択してください。その他に必要な試薬や器具は表 2 から表 4 を参照にしてください。

表 1 複数タイプの SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット

品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット、96 反応 (いずれか 1 つ)	Agilent	G9997A	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9997B	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9997C	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9997D	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズ付属)、96 反応 (いずれか 1 つ)	Agilent	G9998A	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9998B	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9998C	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9998D	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)

表 2 必要な試薬

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。
1xLow TE Buffer	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC 処理ではないこと
QPCR Human Reference Total RNA	Agilent	750500	指定		
Tween 20	Sigma-Aldrich	P9416-50ML	相当	50 mL	

※SureSelect RNA AMPure XP Beads を含んでいる SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット(G9998A, G9998B, G9998C あるいは G9998D)をご利用の場合は、別途購入する必要はありません。

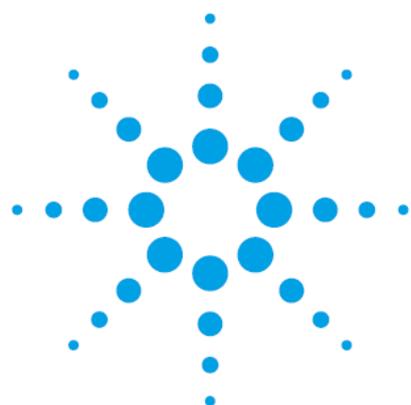
1 はじめに

表 3 必要な消耗品

品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	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 (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を選択して下さい。 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 ・ 96 Armadillo PCR plates (full-skirted), Thermo Fisher Scientific p/n AB2396
PCR plate			指定	
Eppendorf twin.tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	9510200040 1	指定	Eppendorf p/n 951020619 または Armadillo PCR plates, 96-wells (full-skirted) Thermo Fisher Scientific p/n AB2396 でも可
Agilent Reservoirs, Single cavity, 96 pyramids base geometry, 19 mm height	Agilent	201254-100	指定	本文中表記: Agilent Shallow Well Reservoir
Agilent Reservoirs, Single cavity, 96 pyramids base geometry, 44 mm height	Agilent	201244-100	指定	本文中表記: Agilent Deep Well Reservoir
Agilent Storage/Reaction Microplates, 96 wells, 2 mL/square well	Agilent	201244-100	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。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	022431021	相当	核酸の吸着が少ない LoBind タイプを使用ください。
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		相当	
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	

表 4 核酸 QC プラットフォーム - いずれかの装置を選択してください

品名	製造 メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent 4150/4200 TapeStation System					
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991AA / G2992AA	指定		
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		
RNA Screen Tape	Agilent	5067-5576	指定	7 枚	1 枚で最大 16 サンプル測定できます。
RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5577		最大 112 サンプル分	
RNA ラダ	Agilent	5067-5578			オプション
High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579	指定	7 枚	1 枚で最大 16 サンプル測定できます。
High Sensitivity RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5580		最大 112 サンプル分	
High Sensitivity RNA ラダ	Agilent	5067-5581			オプション
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。
D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	最大 112 サンプル分	
Agilent 2100 バイオアナライザシステム					
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す。Expert Control Software ver B.02.07 以降が必要です。
Agilent RNA 6000 ピコキット	Agilent	5067-1513	指定	25 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。
Agilent RNA 6000 ナノキット		5067-1511	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 DNA 1000 キット	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 5200/5300/5400 Fragment Analyzer System					
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer	Agilent	M5310AA / M5311AA / M5312AA	指定		
RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-471-0500	指定		
HS RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-472-0500	指定		
NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	Agilent	DNF-473-0500	指定		



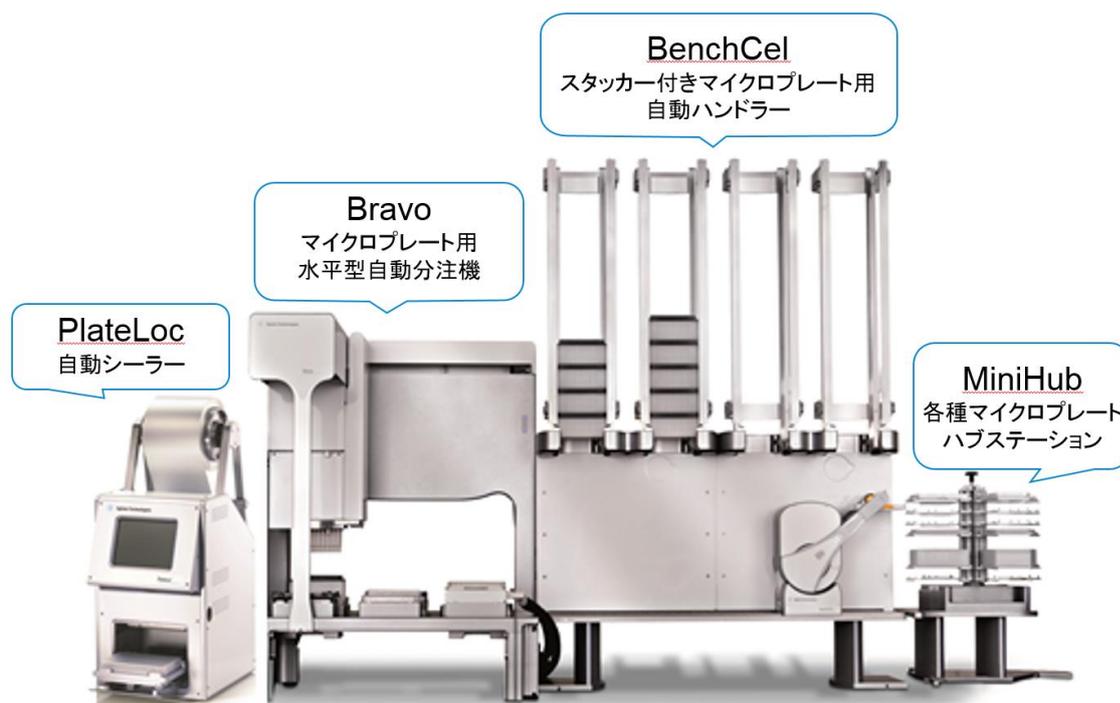
2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect ライブラリ調製

Agilent Bravo NGS 自動化システム	15
Bravo プラットフォームについて	16
ワークフローの概要	27
自動化ランを行う上での実験条件の検討	29

この章では、Agilent Bravo NGS 自動化システムの紹介、SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製の
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 5 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 5 のユーザーガイドを確認してください。SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製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 5 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 μ L から 250 μ L 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 μ L から 175 μ L 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。

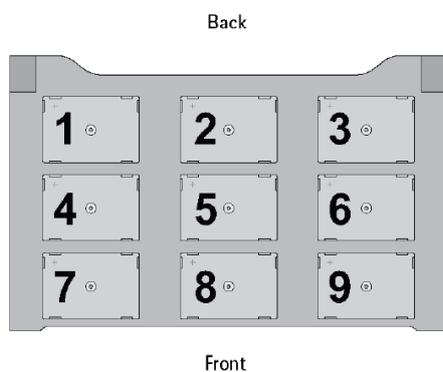


図 1 Bravo プラットフォームデッキ

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 46 ページの図 3 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。

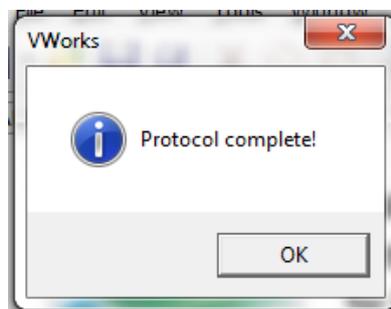
[MiniHub のイニシャライズボタン追加]

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。

Bravo デッキヒートブロックの温度設定

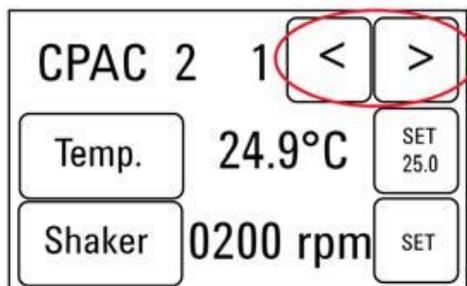
Bravo デッキ 4 番と 6 番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプルプレートをインキュベートするために使用しています。高温 (85°C) または低温 (4°C) でのインキュベーションステップを含むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておく、操作時間を短縮できます。

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 6 のように示されます。

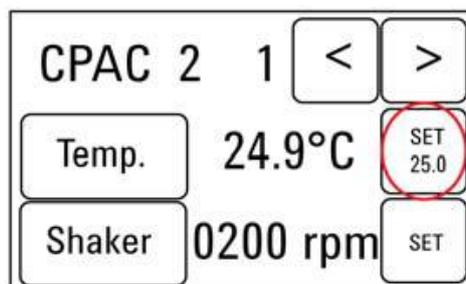
表 6 Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示

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

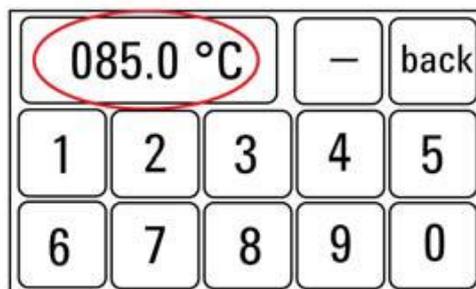
1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置 (CPAC 2 1 または CPAC 2 2) を選択します。



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。

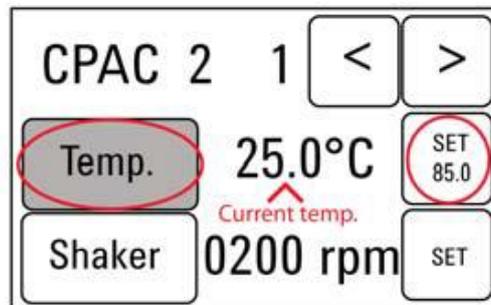


3. テンキーパッドで目的とする温度を入力します。入力した温度は画面の左上に表示されます。正しい温度が表示されたら、その温度表示部分を押し、その温度が入力されたことになります。(表示されただけでは入力したことにならないので、ご注意ください。)



2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect ライブラリ調製

- 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

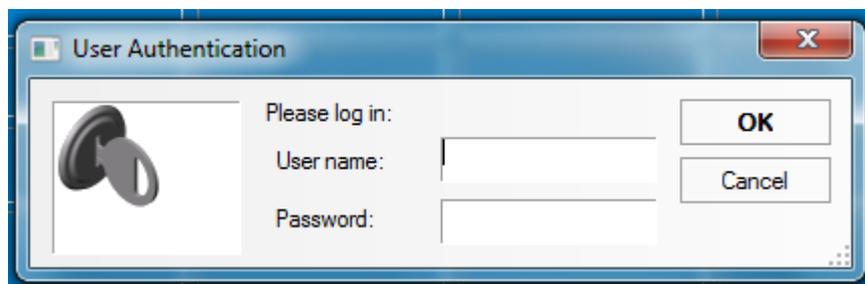
VWorks ソフトウェアはお使いの Agilent Bravo NGS 自動化システム Option B に含まれ、ロボットと周辺機器をパソコンで制御できます。Agilent Bravo NGS 自動化システムには、SureSelect システムに必要な自動分注プロトコルがすべて入った VWorks ソフトウェアがあらかじめインストールされています。VWorks ソフトウェアを使い始める際の一般的な取扱い方と含まれるプロトコルについて、以下に説明します。SureSelect の各ステップの操作で指定された VWorks プロトコルを使用する際に、その VWorks プロトコルが必要となる設定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

2 Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect ライブラリ調製

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るために一度に実行するために使用します。

SureSelect XT HS2 RNA 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_mRNA_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. Processing Plate で正しいプレートタイプが選択されているか確認します。

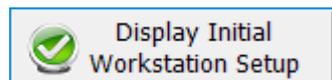
Processing plate は Eppendorf twin.tec plate (Eppendorf p/n 951020401 または 951020619) または 96-well Armadillo plate (Thermo Fisher Scientific p/n AB2396) のいずれかを使用できます。

CAUTION

適切なピペッティングと Bravo 自動化システムへのダメージを避けるために正しい processing plate タイプを選択してください。

3. 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。
4. 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。



5. 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。

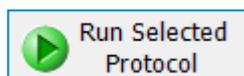
The screenshot displays the software interface for the Agilent NGS Workstation. On the left, the "Protocol Parameters" section includes dropdown menus for "1) Select protocol to execute" (Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA_v.B1.0.2.pro), "2) Select labware for thermal cycling" (96 ABI PCR half skirt in Red Alum Insert), and "3) Select the number of columns of samples to process" (3). Below this is the "Workstation Configuration" section with a "Display Initial Workstation Setup" button. The "Controls" section has a "Run Selected Protocol" button. The "Reference" section shows "Elapsed Time: 00:00:00". The "Executed Protocol & Status" section shows the protocol name. The "Testing Only" section has a "Reduce Incubation Times and Mix Cycles" option.

In the center, there is a graphic of a DNA double helix and the text: "SureSelect^{XT} HS2 mRNA with Strand-Specific RNA Library Prep and Dual Indexing for illumina sequencers". The Agilent logo and "Trusted Answers" are at the bottom.

On the right, the "NGS Workstation B Setup" section shows a "Bravo Deck" layout with 9 positions: 1. Waste Reservoir (Agilent 2ml. Square Well), 2. Empty, 3. Empty, 4. Pelletor (RT-C), 5. Shaker, 6. Pelletor (RT), 7. Magnet, 8. Empty, 9. Chiller (RT). Below this is a "BenchCel 4R" section with a table for "Stacker 1" through "Stacker 4" and "MiniHub" sections for "Shelf 1" through "Shelf 5".

BenchCel 4R				
Stacker 1	Stacker 2	Stacker 3	Stacker 4	
2 Tip Boxes	Empty	Empty	Empty	
MiniHub	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5	Bead Washing Buffer in Agilent DeepWell Plate			
Shelf 4	Bead Elution Buffer in 96 Eppendorf Twin.tec PCR			
Shelf 3	Bead Binding Buffer in 96 Eppendorf Twin.tec PCR			
Shelf 2		Nuclease-free Water in Agilent Shallow Well Reservoir		
Shelf 1				Empty Tip Box

6. 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。

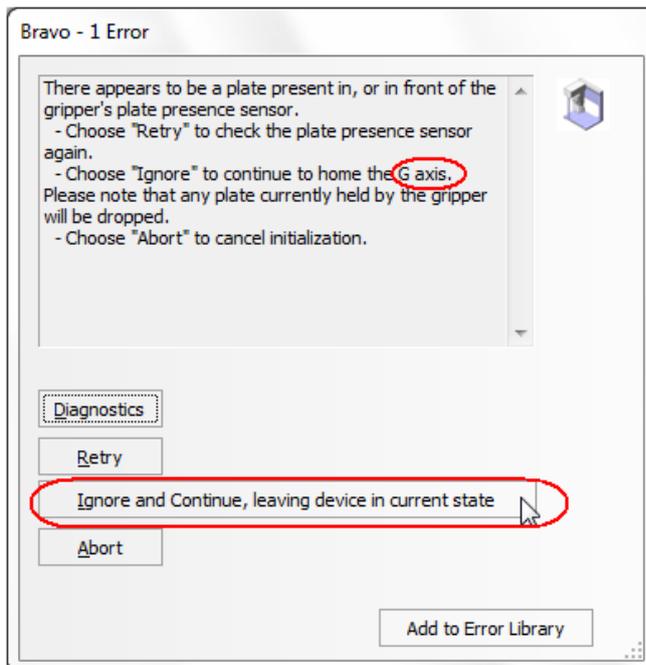


Bravo の初期化

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。

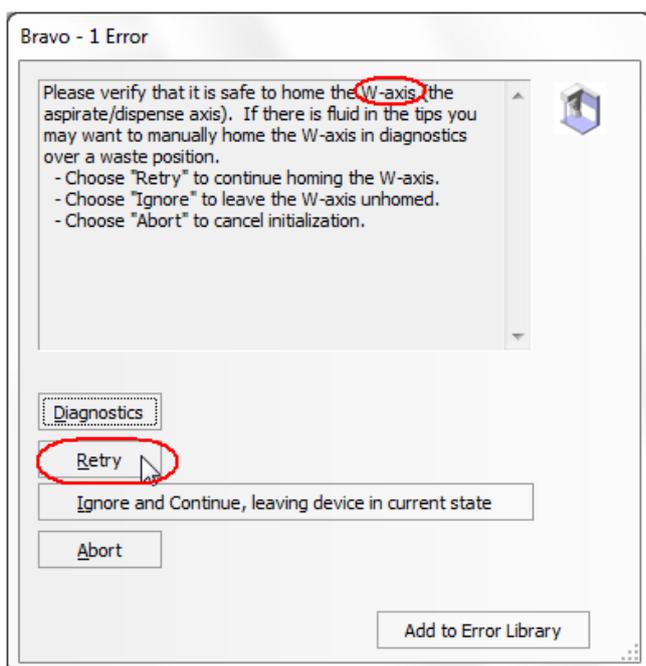
1. 最初はグリッパーの初期化に伴う G axis のエラー表示が出ます。

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。)



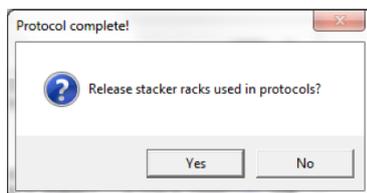
2. そのインジケータに Simulation is on と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押してシミュレーションモードをオフにしてください。

NOTE

XT_HS2_mRNA_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。



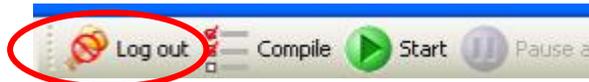
VWorks の終了

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おそれがあります。ログイン後は操作をせずに、ただちに Close してください。

ワークフローの概要

SureSelect XT HS2 mRNA の NGS ライブラリ調製のワークフローを図 2 に示します。

表 7 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する VWorks プロトコルの詳細な説明については各章を参照してください。

SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製プロトコルは Fresh および Fresh frozen サンプルに対応しています。

SureSelect XT HS2 mRNA Library Preparation for NGS Workflow

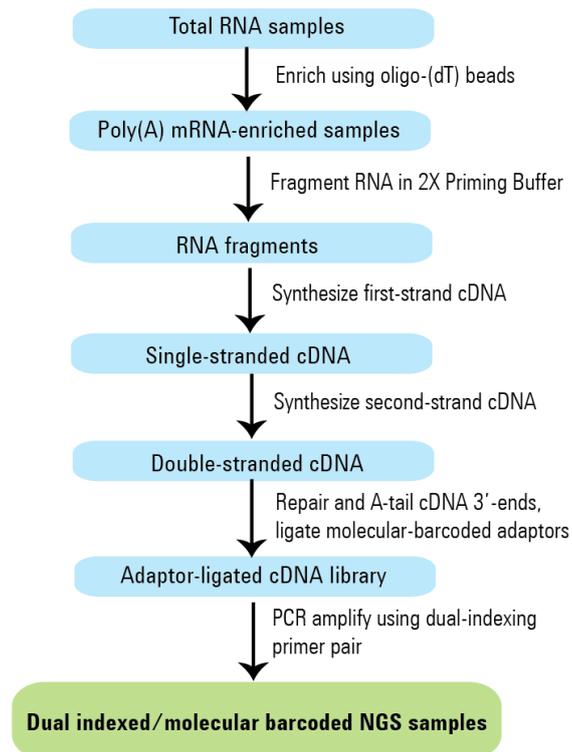


図 2 シーケンスライブラリ調製のワークフロー

ワークフローで使用される自動化プロトコル

表 7 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 Second-Strand Synthesis runset	AMPureXP_Aliquot (Case Second-Strand)
	Aliquot AMPure XP beads for use in the Library Prep runset	AMPureXP_Aliquot (Case Library Prep)
	Aliquot AMPure XP beads for use in the Library Prep runset for low input (<100 ng) or lower-quality (RIN 6–8) libraries	AMPureXP_Aliquot (Case Low Input or Quality)
	Aliquot AMPure XP Beads for use in the PCR purification protocol	AMPureXP_Aliquot (Case PCR)
Poly(A) Selection	Enrich RNA samples for poly(A) mRNA	Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA
RNA Preparation and cDNA Conversion	Fragment mRNA samples	Fragmentation_XT_HS2_mRNA
	Synthesize first-strand cDNA	FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA
	Synthesize and purify second-strand cDNA	SecondStrand_XT_HS2_mRNA
Library Preparation	Prepare duplex, molecular-barcoded cDNA libraries	Runset LibraryPrep_XT_HS2_ILM or Runset LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM (for low input and lower-quality libraries)
Amplification	Amplify indexed cDNA libraries with unique dual indexing primer pair	PCR_XT_HS2_ILM
	Purify indexed cDNA libraries using AMPure XP beads	AMPureXP_XT_HS2_ILM (Case PCR)
	Analyze indexed cDNA libraries using Agilent TapeStation platform	TS_D1000
Pooling	Pool indexed cDNA libraries for multiplexed sequencing	Aliquot_mRNA_Libraries

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。

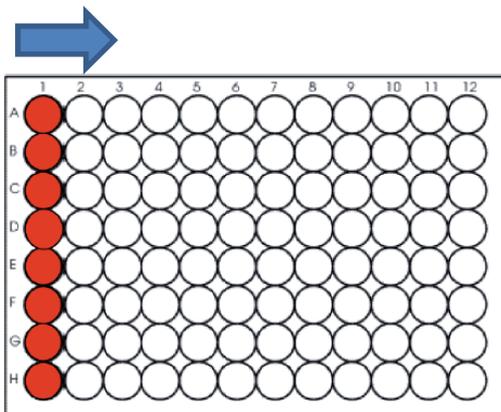
表 8 カラム数とサンプル数の対応表

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。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 cDNA サンプルの位置

- Agilent SureSelect 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。



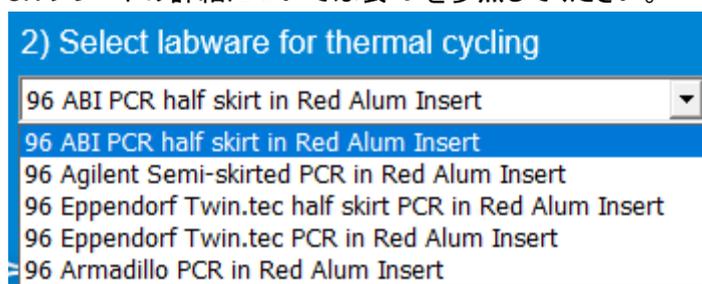
装置の設置について

- ・ ワークフローのいくつかのステップでは、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、遠心してスピンドア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 XTMS2 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 9 を参照してください。



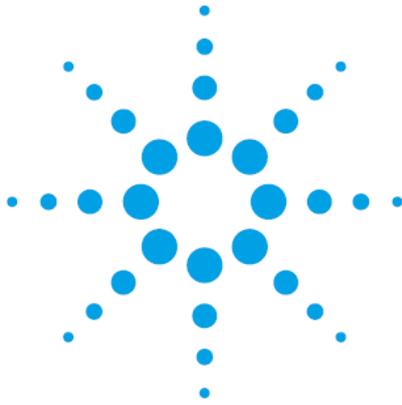
CAUTION

表 9 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 9 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 9 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
96 Armadillo PCR plates (full-skirted)	Thermo Fisher Scientific p/n AB2396



3 Total RNAの準備と品質評価

Step 1. Total RNA の準備と品質の評価	35
Step 2. Total RNA サンプルプレートの準備	37

この章では RNA の品質評価と準備について説明しています。本プロトコルは、新鮮または新鮮凍結サンプル由来の質の高い RNA に適しています。FFPE 由来 RNA には推奨しません。

Step 1. Total RNAの準備と品質の評価

開始前に、各 total RNA をヌクレアーゼフリー水に調製します。ライブラリ調製には 10 ng~1 µg の質の高い total RNA が必要です。次に示すように、RNA integrity が低い RNA は、50 ng 以上の RNA が必要です。

NOTE

本プロトコルは、新鮮あるいは新鮮凍結サンプル由来の質の高い RNA に適しています。FFPE 由来 RNA サンプルには推奨しません。

アジレントの QPCR Human Reference Total RNA (型番 750500) のような、質の高いコントロール RNA サンプルのライブラリ調製を並行して行うようにしてください。特に初めて本プロトコルでライブラリ調製をする場合は、すべてのステップが滞りなく進められたか確認するために使用を強く推奨します。このコントロールを使用することで、RNA サンプルに関連するパフォーマンスの問題と他の要因を区別し、必要なトラブルシューティングに役立ちます。

1. 各 total RNA をヌクレアーゼフリー水に調製します。
2. 少量で計測できる分光光度計を用いて RNA の濃度を計測します。260/280 および 260/230 の吸光度比が両方とも約 1.8 から 2.0 であることを確認します。2.0 より極端に値が乖離している場合は、NGS ライブラリ調製の前に再精製が必要な場合があります。
3. 13 ページの表 4 にある RNA の質を確認するプラットフォームのいずれかを使用して、RNA Integrity Number (RIN) または同等の数値で RNA の質を分析します。これらアジレントのプラットフォームで算出される RIN/RIN[®]/RQN スコアは同等に RNA の分解度を示します。上記ステップ 2 で計測した濃度に基づいて、各プラットフォームのアッセイを選択します。
最適な性能を得るために、total RNA サンプルは RIN > 8 が必要です。RIN > 8 のサンプルは、ライブラリ調製に 10 ng~1 µg の total RNA を使用します。
RIN が 6~8 のサンプルも本プロトコルで使用できますが、50 ng 以上の total RNA を使用してください。
RIN < 6 のサンプルは本プロトコルには適していません。キャプチャを行う SureSelect XT HS2 RNA system をお勧めします。

Step 2. Total RNA サンプルプレートの準備

NOTE

SureSelect XT HS2 mRNA Library preparation のフォームには 2 種類の異なるライブラリ調製ランセットがあります (standard または low-input/low-quality)。RNA のインプット量と品質によって適切なランセットを選択します。すべてのサンプルが同じライブラリ調製ランセットで処理できるようにすることをお勧めします。詳細は表 10 を参照してください。

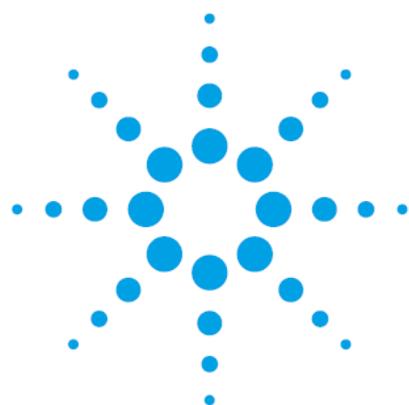
1. 新しい Processing plate (フルスカートタイプの Eppendorf twin.tec または Armadillo plate) の各 Well に RNA サンプルを分注し、ヌクレアーゼフリー水で 25 μ L に希釈します。
RIN を基に決定する RNA インプット量については表 10 を参照します

表 10 では RIN とインプット量を基にした推奨のライブラリ調製ランセットについても記載されています。ライブラリ調製ステップは 65 ページの [Step 1. アダプター付加ライブラリの調製](#)で行います。

表 10 RNA インプット量と推奨のライブラリ調製ランセット

RIN of RNA sample	RNA input quantity	Library Preparation runset
>8	100 ng to 1 μ g	LibraryPrep_XT_HS2_ILM
	10 ng to 100 ng	LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM
6–8	50 ng to 1 μ g	LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM
<6	Not recommended for use	—

2. RNA サンプルプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。47 ページのステップ 2 で使用するまで 4°C で保存します。



4 AMPure XP Bead Platesの準備

Step 1. Second-strand cDNA 合成用ビーズプレートの準備	35
Step 2. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備	37
Step 3. PCR 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ています。各精製ステップで異なるプロトコルで分注した AMPure XP ビーズプレートを使用します。SureSelect XT HS2 mRNA ワークフローの概要については 27 ページの図 2 を参照してください。

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。またプレートにはラベルを貼り、区別がつくようにしてください。

Step 1. Second-strand cDNA合成用ビーズプレートの準備

SecondStrand_XT_HS2_RNA プロトコルでは、各ウェルに 105 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 (Second-Strand) 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 (Second-Strand) 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

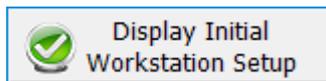
1. 表 11 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 11 AMPureXP_Aliquot (Second-Strand) 用 Bravo デッキの初期配置

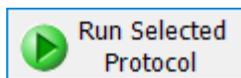
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well Plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (Second-Strand) の実行

1. 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 (Second-Strand) を選択します。
2. 「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。
3. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



4. 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。
5. 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 105 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。

6. 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。

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。

SecondStrand_XT_HS2_RNA プロトコル(61 ページの表 33)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. ライブラリ調製用ビーズプレートの準備

SureSelect XT HS2 mRNA では、LibraryPrep_XT_HS2_ILM と LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM の 2 種類の異なるライブラリ調製ランセットが使用可能です。Total RNA サンプルの品質とインプット量に応じた推奨のランセットの選択については 33 ページの表 10 を参照してください。

どちらのランセットも各ウェルに 80 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 (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。

LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセットの場合には加えて 60 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 (Low Input or Quality) 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) プロトコルの実行

このプロトコルでは 80 μ L のビーズを各 Well に分注します。どちらのライブラリ調製ランセットを使用する場合でもこのビーズプレートは必要になります。

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なければ構いません。

Bravo デッキのセットアップ

4. 表 12 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。

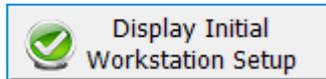
表 12 AMPureXP_Aliquot (Library Prep) 用 Bravo デッキの初期配置

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

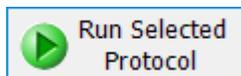
4 AMPure XP Bead Plates の準備

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. 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 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。

ビーズプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。ライブラリ調製プロトコル(69 ページの表 41 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

AMPureXP_Aliquot (Low Input or Quality) プロトコル(必要に応じて実施)

このプロトコルでは 60 μ L のビーズを各 Well に分注します。インプット量が少ないあるいは品質が悪いサンプルを使用する場合のライブラリ調製ランセット(LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM)が必要となります。LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM のライブラリ調製を行わない場合にはこの工程をスキップし、42 ページの Step 3. PCR 精製用ビーズプレートの準備に進んでください。

AMPureXP_Aliquot (Low Input or Quality) 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。

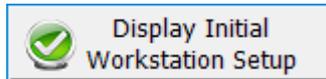
表 13 AMPureXP_Aliquot (Low Input or Quality) 用 Bravo デッキの初期配置

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

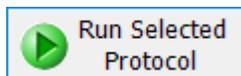
4 AMPure XP Bead Plates の準備

AMPureXP_Aliquot (Low Input or Quality) 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 (Low Input or Quality) 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 60 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。

ビーズプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。

ライブラリ調製プロトコル(69 ページの

11. 表 41 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. PCR精製用ビーズプレートの準備

AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR) プロトコルは 50 μ L のビーズが分注されたプレートを使用します。AMPureXP_Aliquot (PCR) を使用して PCR 精製の為のビーズプレートを準備します。

AMPureXP_Aliquot (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

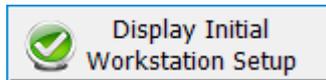
1. 表 14に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

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

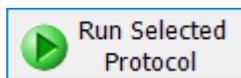
Location	Content
2	New tip box
5	Empty Agilent Deep Well Plate
6	Reservoir of AMPure XP bead suspension prepared in step 3
8	Empty tip box

AMPureXP_Aliquot (PCR) の実行

1. 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 (PCR) を選択します。
2. 「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。
3. Click Display Initial Workstation Setup をクリックします。

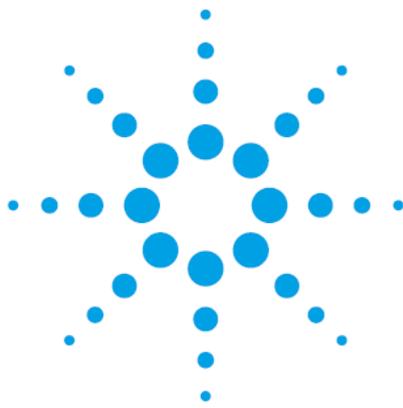


4. ワークステーションがフォームの Workstation setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
5. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



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。

6. 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。
7. 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(79ページの表 53参照)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。



5 Poly-A選択とcDNA変換

Step 1. Total RNA からの poly-A 選択.....	45
Step 2. mRNA サンプルの断片化	49
Step 3. First strand cDNA の合成	54
Step 4. Second strand cDNA 合成と精製	59

この章では、mRNA エンリッチメントと RNA の断片化を含むインプット RNA サンプルの準備と、シーケン斯拉イブラリ調製に先立ち RNA 断片をストランド特異性のある cDNA へ変換するステップを説明しています。

本プロトコルは、新鮮または新鮮凍結サンプル由来の質の高い RNA に適しています。FFPE 由来 RNA には推奨しません。

この章に含まれるプロトコルステップでは、44 ページの表 15 および表 16 の試薬を使用します。操作を始める前に表 15 の試薬を室温にし、表 16 の試薬を融解して氷上におきます。使用前に各試薬は指示の通りに混合してください。

表 15 poly-A 選択プロトコルで使用する前に室温にする試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Oligo(dT) Microparticles (tube with brown cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	45 ページ
Bead Washing Buffer (bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	45 ページ
Bead Elution Buffer (tube with green cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	45 ページ
Bead Binding Buffer (tube with purple cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	45 ページ

表 16 断片化および cDNA 合成ステップで使用する前に融解・氷上におく試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
2X Priming Buffer (tube with purple cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	50 ページ
First Strand Master Mix (amber tube with amber cap)*	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice for 30 minutes then keep on ice	Vortexing	54 ページ
Second Strand Enzyme Mix (tube with blue cap or bottle)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	59 ページ
Second Strand Oligo Mix (tube with yellow cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	59 ページ

*First Strand Master Mix はアクチノマイシン D を含んでおり、特別な準備が必要なく使用できます。光の暴露から守るため、提供されている琥珀色のチューブから移し替えないでください。

Step 1. Total RNA からの poly-A 選択

このステップでは自動化プロトコル Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA を使用し、Bravo NGS 自動化システムはオリゴ(dT)磁石ビーズへの結合・洗浄・溶出を 2 サイクル行うことでポリ A 付加された mRNA を選択的にエンリッチします。

Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA用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 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。
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 85°C に設定してください。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。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番と 6 番にセットします。

試薬プレートの準備

Poly-A 選択自動化プロトコルは複数枚の 96-well plate を Oligo(dT) Microparticles, Bead Binding Buffer, bead Washing Buffer および Bead Elution Buffer の分注に使用します。

1. 表 17 の液量を参照し、各試薬を分注したプレートを 4 種類分準備します。ライブラリ調製を行う列すべてに分注してください。

Oligo (dT) Microparticles は、分注する前に懸濁液の色が均一になり安定するまで、ボルテックスミキサでよく混合します。ボルテックス後もビーズが凝集している場合は、懸濁液が均一になるまで吸引と吐出を繰り返しピペティングしてよく混ぜます。

表 17 Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA で使用する液量とプレート

Reagent	Volume of reagent per well	Plate type
Oligo(dT) Microparticles	26 µL	Processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)
Bead Binding Buffer	26 µL	Processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)
Bead Washing Buffer	370 µL	Agilent Deep Well plate
Bead Elution Buffer	26 µL	Processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)

2. 試薬プレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。使用するまで室温で保存します。

3. プレートを軽く遠心し、溶液内の気泡を取り除きます。

Oligo (dT) Microparticle plate の遠心を行う際には、ビーズが沈殿しない程度に行います。

ウェル内に気泡があると、Bravo 自動化システムによる正確な分注ができない場合があります。ランに使用する前に、プレートを実閉・遠心し、気泡が無いことを確認してください。

Water reservoirの準備

- 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。気泡がある場合にはピペットチップで取り除きます。プロトコルの完了後 Water リザーバーは Second-Strand cDNA 合成でも使用します。

ワークステーションの準備

- 表 18 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 3 を参照します。

表 18 Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA 用 MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Bead Washing Buffer plate (Agilent Deep Well plate) from step 1	—	—	—
Shelf 4	Bead Elution Buffer plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate) from step 1	—	—	—
Shelf 3	Bead Binding Buffer plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate) from step 1	—	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 1	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	—	—	Empty tip box

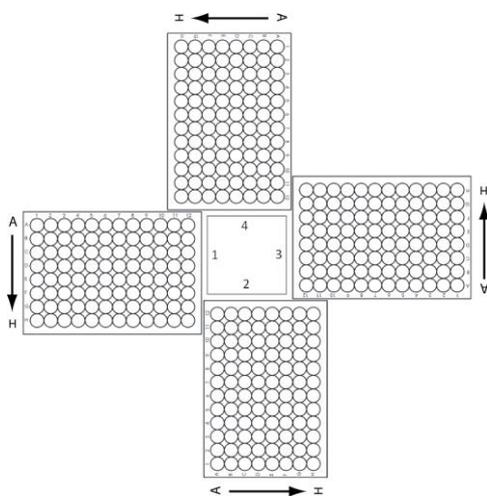


図 3 Agilent Labware MiniHub プレートの向き

5 Poly-A 選択と cDNA 変換

2. 表 19 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 19 Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
4	Total RNA sample plate prepared on page 33 (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate), unsealed and seated in red insert
5	Olido(dT) Microparticle plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate) from step 1 , unsealed
6	Empty red insert

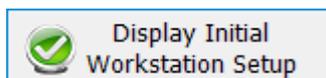
3. 表 20 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 20 Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA 用 BenchCel の初期配置

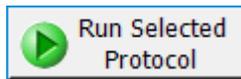
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

Poly-ASelection_XT_HS2_mRNAの実行

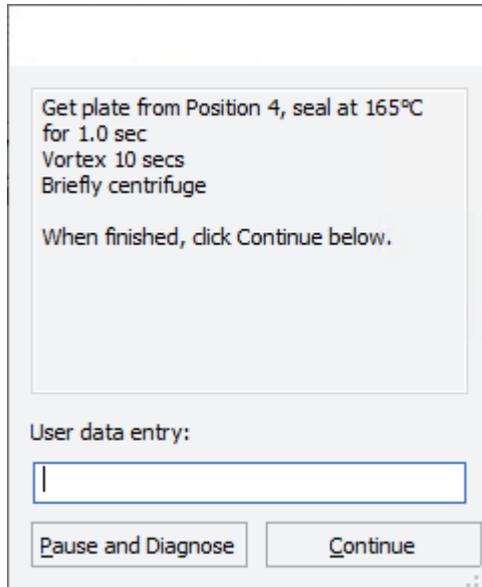
1. セットアップフォームの Select set up form for execute から Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA を選択します。
2. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
3. Processing Plate でセットした 96 well プレートが選択されていることを確認します。
4. Display Initial Workstation 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。
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。



Poly-ASelection_XT_HS2_mRNA の実行には約 1 時間かかります。完了すると、以下のメッセージが表示されます。



8. 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。
9. プレートを 10 秒間ボルテックスし、軽くスピンドウンし気泡を除きます。
10. Continue をクリックします。

mRNA サンプルを氷上に保管し、49 ページの [Step 2. mRNA サンプルの断片化](#)に進みます。

Step 2. mRNA サンプルの断片化

このステップでは Fragmentation_XT_HS2_mRNA 自動化プロトコルを使用します。

mRNA サンプルは cDNA 合成の前に断片化が必要です。このステップでは Bravo NGS 自動化システムにより断片化反応用プレートを準備します。自動化プロトコルの終了後、準備したプレートをサーマルサイクラに移し、94°C で mRNA の断片化を行います。(表 21 のサーマルサイクルプログラム参照)

Fragmentation_XT_HS2_mRNA 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 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. 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 に設定してください。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。
6. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番と 6 番にセットします。

サーマルサイクラの準備

1. 表 21 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 ボタンを押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 21 RNA サンプルの断片化用サーマルサイクラのプログラム*

Step	Temperature	Time
Step 1	94°C	4 minutes
Step 2	4°C	1 minutes
Step 3	4°C	Hold

* サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 20 µL に設定してください。

Fragmentation マスターミックスソースプレートの調製

1. 表 22 に示す容量の 2x Priming Buffer を Agilent Deep Well プレートのカラム 1 の全ての Well に分注します。分注時には 2x Priming Buffer はできる限り氷上に保ちます。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 4 に示します。

表 22 Fragmentation_XT_HS2_mRNA 用マスターミックスソースプレートの調製

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
2X Priming Buffer (tube with purple cap)	Column 1 (A1-H1)	16.0 μ L	27.0 μ L	38.0 μ L	49.0 μ L	76.0 μ L	145.0 μ L

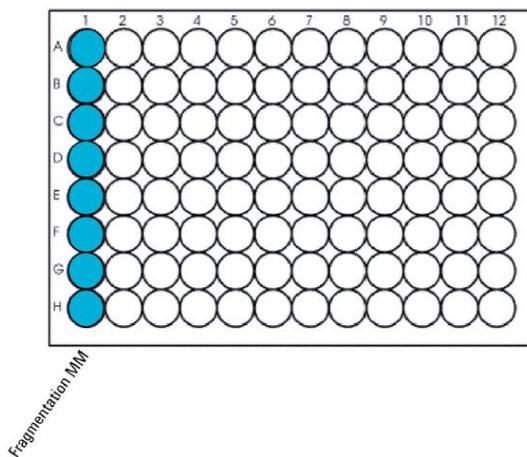


図 4 Fragmentation_XT_HS2_mRNA 用のマスターミックスソースプレートの配置

2. ソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。
3. プレートを軽く遠心し、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。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。

ワークステーションへのセット

1. 表 23 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 3 を参照します。

表 23 Fragmenttation_XT_HS2_mRNA 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 24 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 24 Fragmenttation_XT_HS2_mRNA 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
4	mRNA sample plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate), unsealed and seated in red insert
6	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)
9	Fragmentation master mix source plate, unsealed

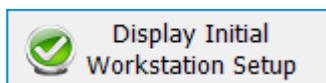
3. 表 25 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 25 Fragmenttation_XT_HS2_mRNA 用 BenchCel の初期配置

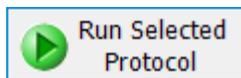
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

Fragmentation_XT_HS2_mRNAの実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Fragmentation_XT_HS2_mRNA 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. Processing Plate でセットした 96 well プレートが選択されていることを確認します。
5. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

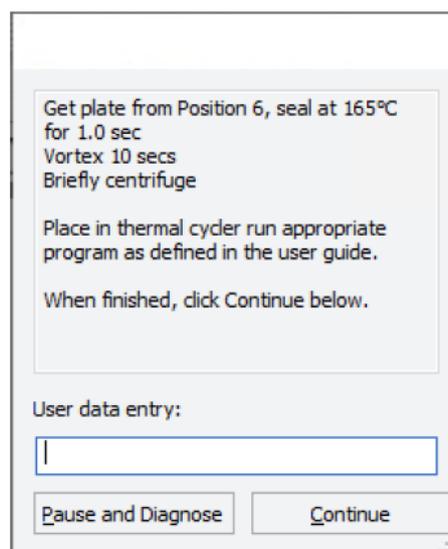


6. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
7. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
8. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



Fragmentation_XT_HS2_mRNA の実行には約 10 分かかります。完了すると、断片化反応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。

9. 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。



5 Poly-A 選択と cDNA 変換

10. プレートに 10 秒間ボルテックスし、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。
11. 表 21 の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し、プログラムを開始します。
12. Continue をクリックすると、以下の指示が表示されます。



13. Bravo デッキから Fragmentation Master Mix を分注した Agilent Deep Well plate を取り出します。同じプレートを 54 ページの First strand cDNA マスターミックスソースプレートの調製でも使用します。
14. MiniHub の Cassette 1 のチップボックスは FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA (56 ページのワークステーションへのセット) でも使用するため、そのまま残します。
15. 表 21 のサーマルプログラムが 4°C に達したらサーマルサイクラからプレートを氷上に移動します。このプレートは first strand cDNA 合成の RNA サンプルに使用します。すぐに 54 ページの [Step 3. First strand cDNA の合成](#) に進みます。

Step 3. First strand cDNAの合成

このステップでは **FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA** プロトコルを使用します。

このステップでは Bravo NGS 自動化システムにより mRNA サンプルと first cDNA 合成用の試薬が入ったプレートを準備します。その後、プレートをサーマルサイクラに移し、first strand cDNA 合成反応を行います。

FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA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に設定してください。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。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番と 6 番にセットします。

First strand cDNA合成用サーマルサイクラの準備

1. 表 26 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 26 First-strand cDNA 合成用サーマルサイクラのプログラム*

Step	Temperature	Time
Step 1	25°C	10 minutes
Step 2	37°C	40 minutes
Step 3	4°C	Hold

* サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 28 μ L に設定してください。

First strand cDNAマスターミックスソースプレートの調製

1. 表 27 に示す容量の First Strand Master Mix を Agilent Deep Well プレートのカラム 2 の全てウェルに加えます。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 4 に示します。

CAUTION

このステップで使用する First Strand Master Mix はとても粘性が高い試薬です。使用前と、他の試薬に混合した後は高速のボルテックスで 5 秒間、徹底的に混合します。この試薬はピペティングでの混合では不十分です。

First Strand Master Mix にアクチノマイシン D が含まれています。追加のアクチノマイシン D は必要ありません。

5 Poly-A 選択と cDNA 変換

表 27 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 用マスターミックスソースプレートの調製

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
First Strand Master Mix (amber tube with amber cap)	Column 2 (A2-H2)	9.0 μ L	13.0 μ L	17.0 μ L	21.0 μ L	29.0 μ L	53.0 μ L

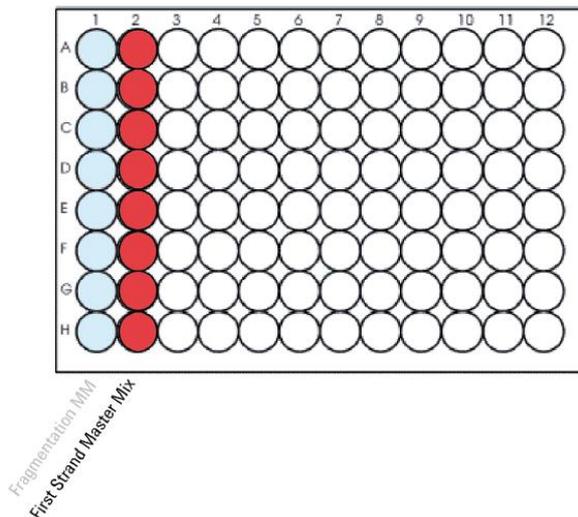


図 5 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 用 **Agilent Deep Well** マスターミックスソースプレートの配置

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。

2. ソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。
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。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。

ワークステーションへのセット

1. 表 28 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 3 を参照します。

表 28 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 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 from Fragmentation protocol (minus tips in column 1)	—	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Used tip box from Fragmentation protocol (with tips in column 1) OR Empty tip box	—	—	Empty tip box

2. 表 29 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 29 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 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 PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)
7	Fragmented mRNA sample plate (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)
9	First Strand cDNA master mix source plate, unsealed

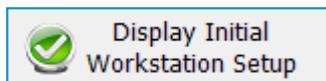
3. 表 30 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 30 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 用 BenchCel の初期配置

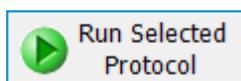
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNAの実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA を選択します。
2. Select Labware for thermal cycling から、Bravo デッキ 6 番と 7 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。

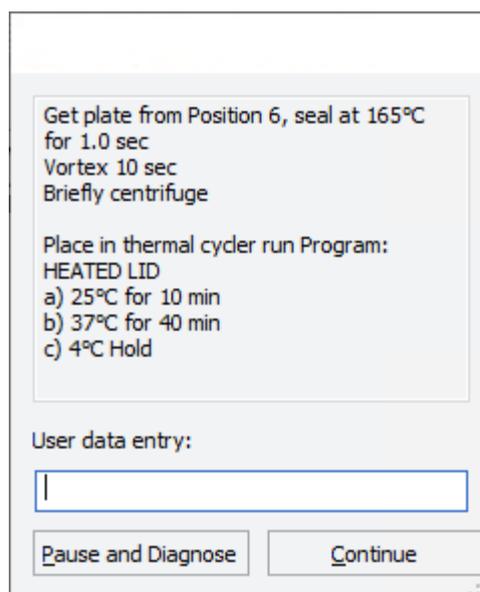


5. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
6. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
7. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA の実行には約 10 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。



2. プレートを軽く遠心し、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。

9. 表 26 の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し、プログラムを開始します。
10. Continue をクリックすると、以下の指示が表示されます。



11. Bravo デッキ 9 番から First Strand cDNA Master Mix ソースプレートとして使用した Agilent Deep Well plate を取り出します。同じプレートを 59 ページの Second strand cDNA マスターミックスソースプレートの調製でも使用します。
12. MiniHub の Cassette 1 のチップボックスは SecondStrandcDNA_XT_HS2_mRNA (61 ページのワークステーションへのセット) でも使用するため、そのまま残します。
13. サーマルプログラムが 4°C に達したらサーマルサイクラからプレートを氷上に移動します。このプレートは first strand cDNA 合成の RNA サンプルに使用します。すぐに 59 ページの [Step 4. Second strand cDNA 合成と精製](#)に進みます。

Step 4. Second strand cDNA合成と精製

このステップでは SecondStrand_XT_HS2_RNA の自動化プロトコルを使用し、Bravo NGS 自動化システムによって first strand cDNA を鋳型とした second strand cDNA の合成と精製を行います。精製では 37 ページで分注した AMPure XP beads を使用します。

SecondStrand_XT_HS2_RNA用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 4 番の温度をあらかじめ 16°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. 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 に設定してください。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。
6. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番と 9 番にセットします。

Second strand cDNA マスターミックスソースプレートの調製

1. 表 31 に従い、適切な Second strand DNA 合成用マスターミックスを調製します。調製時には以下のリキッドハンドリングステップを参照してください。
 - a. 溶かした Second Strand Enzyme Mix を高速のボルテックスミキサーで 5 秒間ボルテックスします。

CAUTION

Second Strand Enzyme Mix はとても粘性が高い試薬です。この試薬はピペティングでの混合では不十分です。

- b. Second Strand Enzyme Mix を 1.5 mL Eppendorf tube に移します。全量に移せるようゆっくりとピペティングします。
- c. Second Strand Oligo Mix を加え、15~20 回ピペティングします (扱う液量が多い場合は、ピペティングの代わりに 20~30 秒間高速でボルテックスします)。スピンドウンし、氷上に保存します。

表 31 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 用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
Second Strand Enzyme Mix (bottle)	25 µL	265.6 µL	478.1 µL	690.6 µL	903.1 µL	1353.0 µL	2709.4 µL
Second Strand Oligo Mix (tube with yellow cap)	5 µL	53.1 µL	95.6 µL	138.1 µL	180.6 µL	270.6 µL	541.9 µL
Total Volume	30 µL	318.7 µL	573.7 µL	828.7 µL	1083.7 µL	1623.6 µL	3251.3 µL

- 表 32 に示す容量の Second Strand Master Mix を Agilent Deep Well プレートのカラム 3 の全ての Well に分注します。分注時に Second Strand Master Mix はできる限り氷上に保ちます。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 6 に示します。

表 32 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 用マスターミックスソースプレートの調製

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
Second Strand Master Mix	Column 3 (A3-H3)	36.0 μ L	67.0 μ L	98.0 μ L	129.0 μ L	196.0 μ L	400.0 μ L

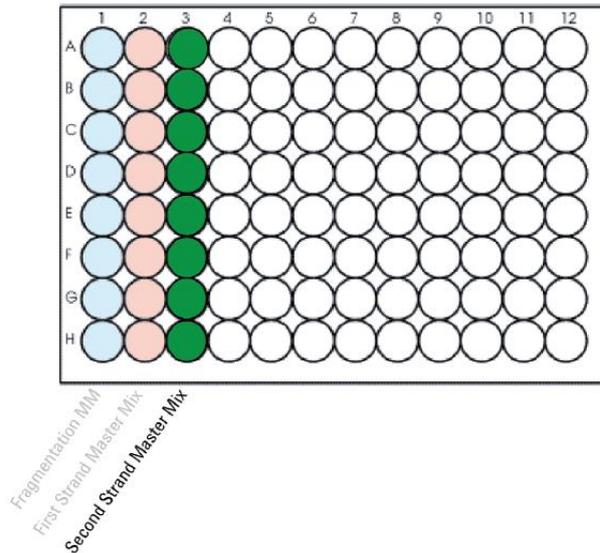


図 6 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 用 Agilent Deep Well マスターミックスソースプレートの配置
以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています。

- ソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、1 秒でシールします。
- プレートを軽く遠心し、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。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。

Second strand 合成用試薬の準備

- 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。気泡がある場合にはピペットチップで取り除きます。プロトコル完了後、このリザーバーはライブラリ調製ランセットでも使用します。
- 50 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。

ワークステーションへのセット

1. 表 33 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 3 を参照します。

表 33 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 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 35 (105 µL of beads/well)	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)	—	—
Shelf 2	New tip box from First Strand protocol (minus tips in columns 1 and 2)	Nuclease-free water reservoir from step 1	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Used tip box from First Strand protocol (with tips in columns 1 and 2) OR Empty tip box	70% ethanol reservoir from step 2	—	Empty tip box

2. 表 34 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 34 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 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
5	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)
6	Second Strand master mix source plate, unsealed
9	First strand cDNA samples in PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under Parameter 2)

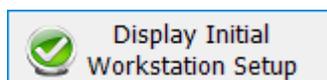
3. 表 35 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 35 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 用 BenchCel の初期配置

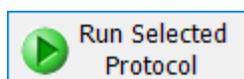
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	6 Tip boxes	—	—	—

SecondStrand_XT_HS2_RNAの実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から SecondStrand_XT_HS2_RNA を選択します。
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. Processing Plate でセットした 96 well プレートが選択されていることを確認します。
5. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



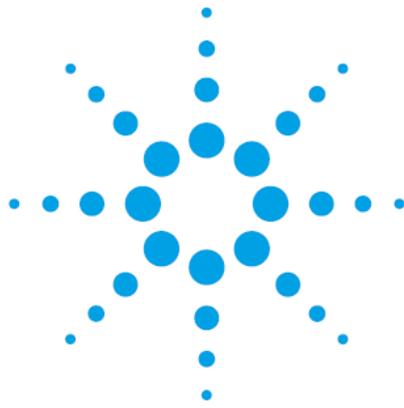
6. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
7. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
8. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



SecondStrand_XT_HS2_RNA の実行には約 2 時間かかります。完了すると精製された cDNA サンプルはライブラリ調製に進むことができます。サンプルは Bravo デッキ 7 番のプレートに入った状態になります。cDNA サンプルを Bravo デッキから取り出し、氷上に置きます。この cDNA サンプルはサイドライブラリ調製ランセットを行う際にセットします (LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM)。

Bravo デッキ 6 番から Second Strand Master Mix ソースプレートとして使用した Agilent Deep Well plate を取り出します。同じプレートをライブラリ調製ランセットで使用します。

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。



6. ライブラリ調製

Step 1. アダプター付加ライブラリの調製.....	65
Step 2. アダプター付加ライブラリの増幅.....	72
Step 3. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製.....	78
Step 4. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認.....	81

この章では、イルミナペアリードプラットフォームを用いたシーケンスのための cDNA NGS ライブラリの自動調製の手順について説明しています。SureSelect XT HS2 mRNA ワークフローの概要については 27 ページの図 2 を参照ください。

高品質 (RIN>8) の total RNA サンプルを使用する場合、10 ng~1 µg の total RNA インプット量を必要とします。質が低い (RIN6~8) の total RNA の場合は 50 ng~1 µg の total RNA インプット量を必要とします。最適な結果を得るためには推奨範囲内で使用できる最大量の RNA インプットを使用してください。少量のサンプル (10~50 ng) の場合分子バーコードを用いた解析を推奨します。

6. ライブラリ調製

Step 1. アダプター付加ライブラリの調製

このステップでは LibraryPrep_XT_HS2_ILM と LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM 2 種類のライブラリ調製ランセットのうちいずれかを使用します。Total RNA サンプルの品質とインプット量に応じた推奨のランセットの選択については 33 ページの表 10 を参照してください。

CAUTION

アダプター付加ライブラリを調製する際、ライブラリ調製ランセットによって、手順の一部が異なります。必ず、選択したランセットに適した手順に従ってください。

また、このステップでは 37 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。少量または低品質サンプル用のライブラリ調製ライブラリを行う際には、追加の AMPure XP ビーズプレート(39 ページ参照)が必要になります。

このステップでは、Agilent Bravo NGS 自動化システムは SureSelect ライブラリ調製に必要な 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 Bravo 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 36 に示す試薬を使用します。使用前に表 36 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。

表 36 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 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	66 ページ
Ligation Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	67 ページ
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (tube with orange cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	66 ページ
T4 DNA Ligase (tube with blue cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	67 ページ
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (tube with green cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	67 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 20°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。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 4 番にセットします。

末端修復/dA付加マスターミックスの調製

1. 表 37 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 37 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 (bottle)	16 µL	204 µL	340 µL	476 µL	612 µL	936 µL	1944 µL
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (tube with orange cap)	4 µL	51 µL	85 µL	119 µL	153 µL	234 µL	486 µL
Total Volume	20 µL	255 µL	425 µL	595 µL	765 µL	1170 µL	2430 µL

6. ライブラリ調製

ライゲーションマスターミックスの調製

1. 表 38 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、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ニカルチューブに入れます。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 38 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 (bottle)	23 µL	293.3 µL	488.8 µL	684.3 µL	879.8 µL	1407.6 µL	2834.9 µL
T4 DNA Ligase (tube with blue cap)	2 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	122.4 µL	246.5 µL
Total Volume	25 µL	318.8 µL	531.3 µL	743.8 µL	956.3 µL	1530 µL	3081.4 µL

Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製

1. 表 39 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 39 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	151.4 µL	282.1 µL
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (tube with green cap)	5 µL	85.0 µL	127.5 µL	170.0 µL	212.5 µL	302.8 µL	564.2 µL
Total Volume	7.5 µL	127.5 µL	191.3 µL	255.0 µL	318.8 µL	454.2 µL	846.3 µL

マスターミックスソースプレートの調製

1. 表 40 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 7 に示します。

表 40 LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセット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 4 (A4-H4)	31.0 μ L	52.0 μ L	73.0 μ L	94.0 μ L	140.0 μ L	280.0 μ L
Ligation master mix	Column 5 (A5-H5)	36.0 μ L	62.0 μ L	88.0 μ L	114.0 μ L	180.0 μ L	366.5 μ L
Adaptor Oligo Mix dilution	Column 6 (A6-H6)	15.0 μ L	22.5 μ L	30.0 μ L	37.5 μ L	56.3 μ L	105.0 μ L

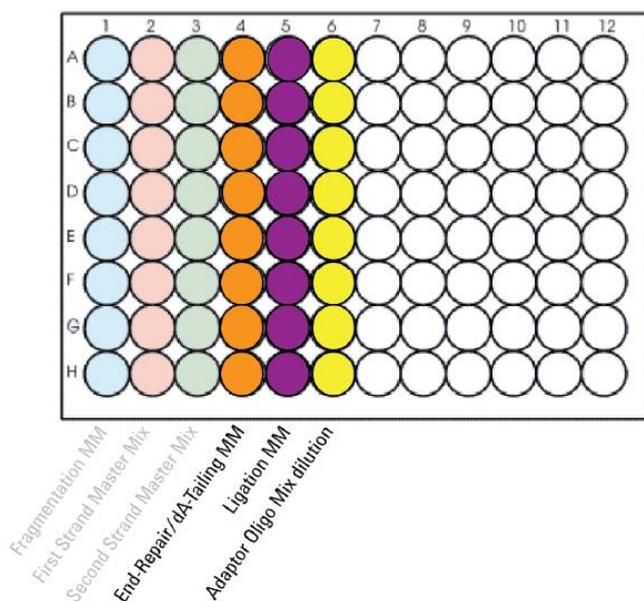


図 7 LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2 用 **Agilent Deep Well** マスターミックスソースプレートの配置

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。

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. プレートを軽く遠心し、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。

6. ライブラリ調製

精製用試薬の準備

- 35 mL の水を入れた Agilent shallow well reservoir を用意します。
SecondStrand_XT_HS2_RNA 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。
- 70%エタノールを入れた、Agilent deep well reservoir を準備します。必要な液量は使用するランセットによって異なります。
 - LibraryPrep_XT_HS2_ILM ランセットの場合、50 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。
 - LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセットの場合、100 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。

ワークステーションへのセット

- 表 41 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 3 を参照します。

NOTE

少量または低品質サンプル用の LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセットの場合は cassette 2, shelf 5 に追加のプレートが必要になります。LibraryPrep_XT_HS2_ILM ランセットでは必要ありません。

表 41 LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセット用 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 37 (80 µL of beads/well)	For LILQ only: Aliquoted AMPure XP beads in Agilent deep well plate from page 39 (60 µL of beads/well)	—	—
Shelf 4	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)	—	—	—
Shelf 3	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)	—	—
Shelf 2	New tip box from Second Stand protocol (minus tips in columns 1–3)	Nuclease-free water reservoir from step 1	—	—
Shelf 1 (Bottom)	Used tip box from Second Strand protocol (with tips in columns 1–3) OR Empty tip box	70% ethanol reservoir from step 2	—	Empty tip box

2. 表 42 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。

表 42 LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセット用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste plate (Agilent 2 mL square well)
4	Empty red insert
5	Empty processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)
7	Processing plate containing cDNA samples
9	Library Prep master mix source plate, unsealed

3. BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。使用するライブラリ調製ランセットによって変わります。

- LibraryPrep_XT_HS2_ILM ランセットの場合、表 43 に従ってください。
- LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセットの場合、表 44 に従ってください。

表 43 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	—	—	—

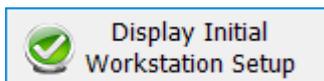
表 44 LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM 用 BenchCel の初期配置

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

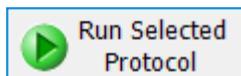
6. ライブラリ調製

LibraryPrep_XT_HS2_ILMまたはLibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILMの実行

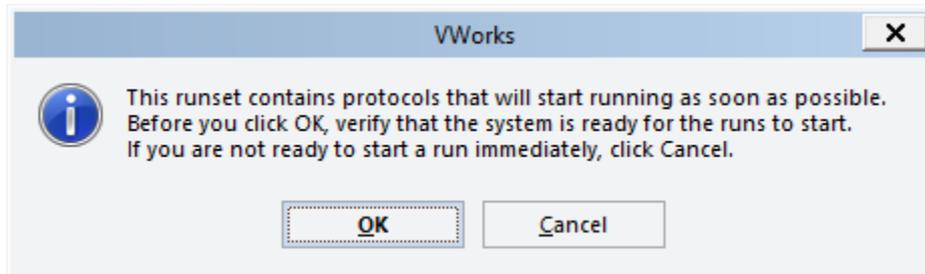
1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から適切なランセットを選択します。
 - ・ 通常のサンプルの場合は **LibraryPrep_XT_HS2_ILM** を選択します。
 - ・ 少量または低品質のサンプルの場合は **LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM** を選択します。
2. Select the number of columns of samples to be processed から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。
3. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



4. 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。
5. 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。
6. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



7. 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 ランセットの実行には約 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。

Step 2. アダプター付加ライブラリの増幅

このステップでは PCR_XT_HS2_ILM プロトコルを使用します。

このステップでは Agilent Bravo NGS 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 プレートを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 45 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 45 PCR 増幅に使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (tube with red cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15-20 times	74 ページ
5x Herculase II Reaction Buffer (tube with clear cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	74 ページ
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR),* -20°C	Vortexing	73 ページ

*Index primer pairs は 96-well plate に入っています。

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。

SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs は 1 回分の液量で提供されています。ライブラリのクロスコンタミネーションを避けるため、後の実験に残った試薬の再利用はしないでください。

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。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 6 番にセットします。

6. ライブラリ調製

サーマルサイクラの準備

1. 表 46 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 46 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	9 to 16 (see Table 47 for RNA input-based cycle number recommendations)	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 47 推奨 PCR サイクル数

Quantity of Input Total RNA	Cycles
1000 ng	9 cycles
250 ng	11 cycles
100 ng	12 cycles
50 ng	14 cycles
10 ng	16 cycles

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの準備

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 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 75 ページの step 2 で使用する際に Bravo デッキにセットします。

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 48 に従い、適切な 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 15~20 秒混合し、氷上に置きます。

表 48 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 (tube with clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340µL	425 µL	574 µL	1066 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (tube with 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. 表 49 に示された量の PCR master mix を Processing plate (フルスカートタイプの Eppendorf twin.tec または Armadillo plate) カラム 1 の全てのウェルに加えます。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 8 を参照ください。

表 49 PCR_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 Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
PCR Master Mix	Column 1 (A1-H1)	22 µL	33 µL	44 µL	55 µL	77 µL	143 µL

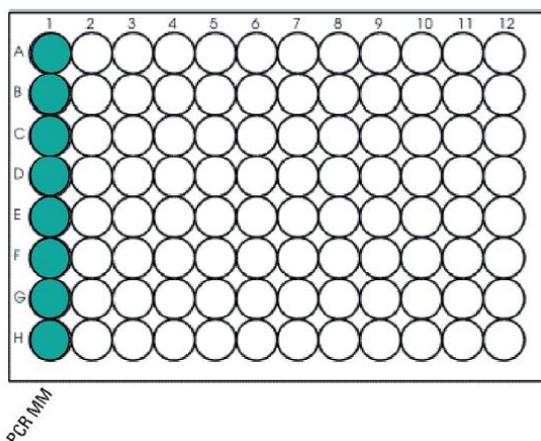


図 8 PCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの配置

6. ライブラリ調製

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. プレートを軽く遠心し、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。

ワークステーションへのセット

1. 表 50 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 3 を参照します。

表 50 PCR_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 51 に従い、Bravo デッキにプレートなどをセットします。

表 51 PCR_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 processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)
9	PCR master mix source plate, unsealed

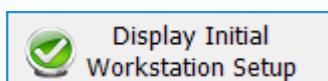
3. 表 52 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 52 PCR_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	—	—	—

PCR_XT_HS2_ILMの実行

1. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から PCR_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. Processing Plate で適切なプレートタイプが選択されていることを確認します。詳細は 22 ページを参照ください。
5. Display Initial Workstation Setup をクリックします。

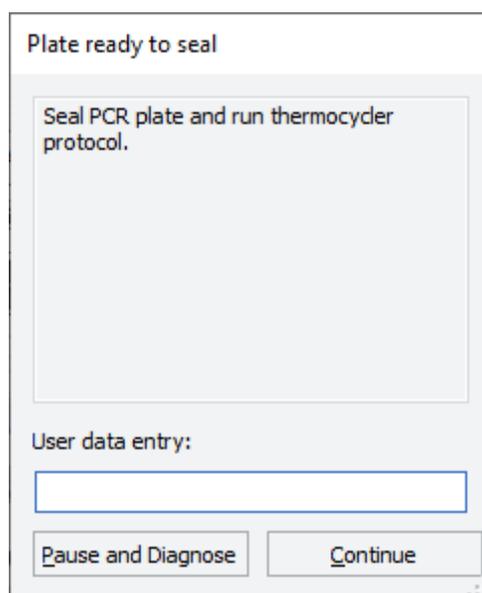


6. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
7. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
8. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



PCR_XT_HS2_ILM プロトコルの実行には約 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。

9. 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。



10. プレートを軽く遠心し、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. ライブラリ調製

11. 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表 46 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レート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 3. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

このステップでは自動化プロトコル AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR)を使用し、Agilent Bravo NGS 自動化システムによって増幅したライブラリの AMPure XP beads による精製を行います。

また、このステップでは 42 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。

ワークステーションと試薬の準備

1. Bravo デッキ 9 番に残っている 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 プロトコルで使用します(81 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 6 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。
5. Red PCR plate insert を Bravo デッキ 6 番にセットします。
6. 30 mL の 1x TE が入った Agilent shallow well reservoir を用意します。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。
7. 50 mL の 70%エタノールの入った Agilent deep well reservoir を準備します。

6. ライブラリ調製

8. 表 53 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 53 AMPureXP_XT_HS2_ILM (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 processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)	—	—
Shelf 2	—	1X Low TE Buffer reservoir from step 6	—	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 7	—	Empty tip box

9. 表 54 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします

表 54 AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR) 用 Bravo デッキの初期配置

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

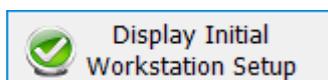
10. 表 55 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 55 AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR) 用 BenchCel の初期配置

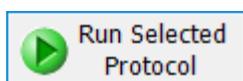
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

AMPureXP_XT_HS2_ILM (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 (PCR) 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. Processing Plate で適切なプレートタイプが選択されていることを確認します。詳細は 22 ページを参照ください。
5. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



6. 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。
7. 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。
8. 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。

9. Bravo デッキ 7 の精製された DNA サンプルを取り出し、軽く遠心した後、氷上に置きます。

Step 4. 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_D1000) を用いて準備し、Agilent 4200 TapeStation を用いて分析を行う (81 ページの Option1: 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 (85 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)

Option1: 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 (20 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. PCR_XT_HS2_ILM で使用したソースプレート (Eppendorf twin.tec または Armadillo plate) 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 56 に従い、カラム 2 の各ウェルに D1000 Sample Buffer を加えます。

表 56 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 Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
D1000 Sample Buffer	Column 2 (A2-H2)	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 2 に分注してください。

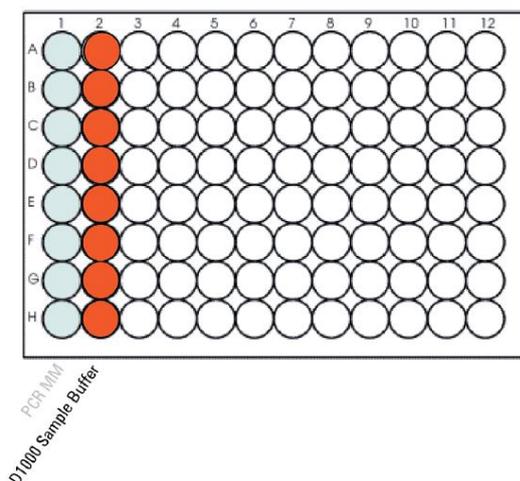


図 9 TS_D1000用 Eppendorf twin.tec マスターミックスソースプレートの配置
以前のプロトコルで分注したマスターミックスは灰色で表記しています。

ワークステーションの準備

6. 図 3 に示すプレートの向きを参照に、表 57 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 57 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

7. 表 58 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 58 TS_D1000 用 Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Amplified libraries in processing plate (unsealed)
6	Empty TapeStation analysis plate (Agilent p/n 5042-8502)
9	Source plate containing D1000 Sample Buffer in Column 2

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。

6. ライブラリ調製

8. 表 59 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 59 TS_D1000 用 BenchCel の初期配置

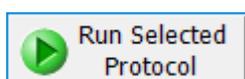
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

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。

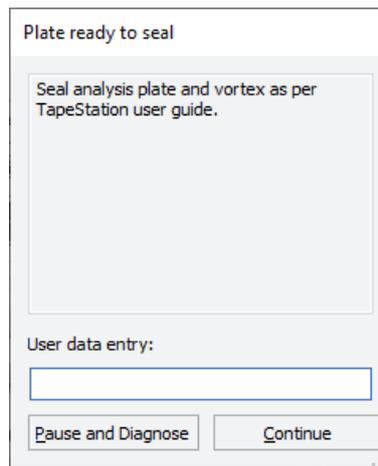


12. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか確認します。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。
13. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
14. 確認後、Run Selected Protocol をクリックします。



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をシールし氷上に置きます。

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ー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 60 のガイドラインを参照ください)。エレクトロフェログラム例は図 10 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、シーケンシングの工程に進むことができます。その他については 117 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 60 ライブラリの定性ガイドライン

Expected library DNA fragment size peak position	NGS read lengths supported
200 to 700 bp	2 × 100 reads or 2 × 150 reads

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。

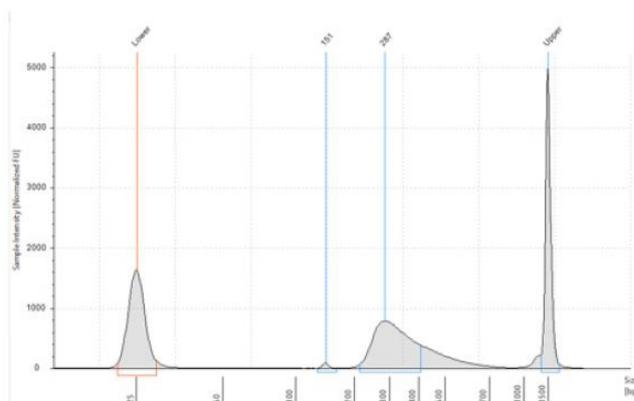


図 10 D1000 ScreenTape で解析した最終 mRNA ライブラリ

6. ライブラリ調製

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。

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)

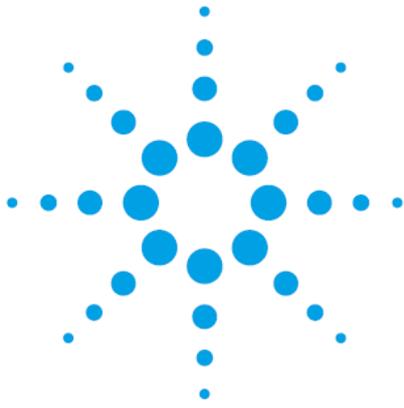
マニュアルでのサンプル調製を行い、Agilent 2100 バイオアナライザ、Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer、Agilent 4200/4150 TapeStation を用いて解析を行うことができます。

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(表 60 を参照)。分析オプションについて表 61 を参照ください。

表 61 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 µL of sample mixed with 3 µL of D1000 sample buffer
Agilent 2100 BioAnalyzer system	DNA 1000 Kit	Agilent DNA 1000 Kit Guide	1 µL 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 µL of sample

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。



7 マルチプレックスシーケンスガイドライン

Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional)	87
Step 2. シーケンスサンプルの調製	91
Step 3. シーケンスの開始とデータ解析	93

この章ではインデックスおよび分子バーコード付加がされたサンプルをプールする手順と、マルチプレックスシーケンスのガイドラインについて説明しています。

Step 1. マルチプレックスシーケンス用サンプルのプール (optional)

NOTE

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、必ずイル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 62 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 62 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 11 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 につづすサンプルの液量(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 11 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

7 マルチプレックスシーケンスガイドライン

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。

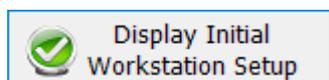
C:\¥VWorks Workspace¥NGS Option B¥XT_HS2_ILM_v.Bx.x.x¥Aliquot Input File Templates¥Aliquot_Captures_Template.csv (x.x.x はバージョン番号)
Aliquot_Captures_Template.csv ファイルをコピーし、各 Aliquot_Water ランの csv ファイルを作成するためのテンプレートとして使用できます。12 カラム (96 サンプル) より少ないランのテンプレートとして使用する場合、使用しない Well の情報は削除してください。

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¥NGSOption 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 63 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 63 Aliquot_mRNA_Libraries 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 processing plate (Eppendorf twin.tec or Armadillo plate)

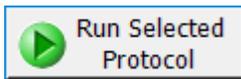
6. セットアップフォームの「Select protocol to execute」から Aliquot_mRNA_Libraries を選択します。
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. 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。
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 2. 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 12 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。

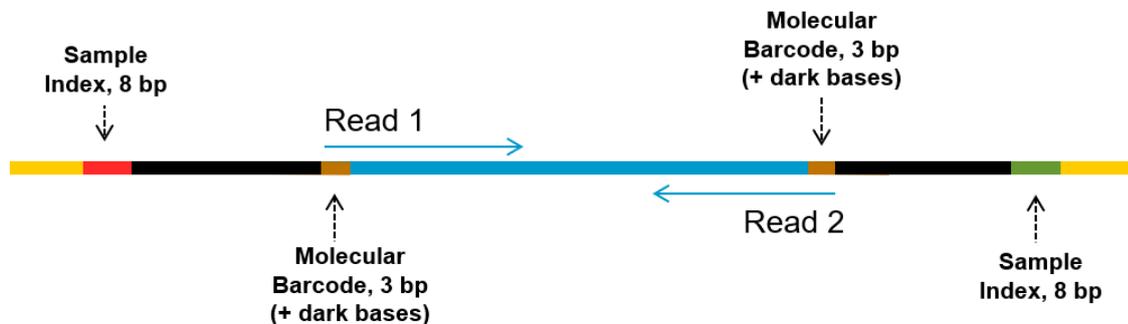


図 12 SureSelect XT HS2 シーケンスライブラリの構造

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 64 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 64 に示されています。

SureSelect 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 64 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 64 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 64 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

Step 3. 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、103 ページ 表 72 から 110 ページ 表 79 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。94 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。94~95 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 の間違っただけのペアを除きます。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 97 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、97 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。
- ・ライブラリフラグメントは、各ストランドに degenerated 分子バーコードが含まれます(45 ページ図 3 参照)。両方のストランドが存在し、ストランド内の MBC を一致させて二重のコンセンサスリードを形成する DNA とは異なり、一本鎖 RNA の解析は片方の鎖の分子バーコードを使用したコンセンサスリードの形成に限定されることに注意してください。
- ・分子バーコード配列と dark base は、リード 1 およびリード 2 両方の 5'端に含まれます。分子バーコードの抽出やトリミングは AGeNT の使用を推奨します(詳細は 51 ページをご覧ください)。ご使用のシーケンス解析パイプラインが分子バーコードを排除し、AGeNT と互換性がない場合、51 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。

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 65 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 65 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 65 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 65 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、103~110 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。

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

3. 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	ATTGAGAA	D501	TATAGCCT		
6	6	Plate1	A06	D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT		

4. 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 103~110 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]									
ItemLevel	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 13 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 RNA 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デマルチプレックスを行い、ペアエンドリードを作成し、不正確な P5 および P7 インデックスペアの配列を除去します。

デマルチプレックスを行った FASTQ データは、Agilent Genomics NestGen Toolkit (AGeNT) を用いて前処理し、シーケンシングアダプターの除去および分子バーコード (MBC) 配列の抽出を行う必要があります。AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、MBC の前処理、アダプターのトリミングやデュPLICATEリードの識別を行います。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ティング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.genomics.agilent.com の AGeNT ページをご覧ください。また、XT HS2 RNA ライブラリに適した処理については AGeNT Best Practices のドキュメントをご覧ください。

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 12 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。

トリミングしたリードは、適切な RNA データアライメントツールを用いてアライメントする必要があります。アライメントが完了したら、AGeNT CReaK (Consensus Read Kit) ツールを使用し、一本鎖コンセンサスモードでコンセンサスリードの生成やデュPLICATEのマークまたは削除することが可能です。出来上がった BAM ファイルは、遺伝子発現解析やバリエーションディスカバリを含む下流の解析に使用できます。

NOTE

CReaK は AGeNT version 3.0 内のデデュPLICATIONツールであり、従来の AGeNT LocalIt の代替として含まれています。LocalIt 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。LocalIt は引き続き使用可能ですが、CReaK の使用を推奨しています。

RNA鎖特異性のガイドライン

SureSelect XT HS2 mRNA シーケンシングライブラリ調製方法は、2nd ストランド合成時に dUTP を使用することで RNA 鎖特異性を保持しています。P5 端から始まるリード 1 の配列は、poly(A) RNA トランスクリプト鎖の相補鎖です。P7 端から始まるリード 2 の配列は、poly(A)RNA トランスクリプト鎖と一致します。解析時にストランド特異性を決めるには、この情報を含める必要があります。例えば RNA シーケンシングメトリクスを計算するために Picard ツール (<https://broadinstitute.github.io/picard>) を使用する場合、ストランド特異性のメトリクスを正確に計算するために STRAND_SPECIFICITY=SECOND_READ_TRANSCRIPTION_STRAND というパラメータを含めることが重要です。



8 リファレンス

キットの内容.....	100
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報.....	102
インデックスプライマーペアのプレートマップ.....	111
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..	113
クイックリファレンス: その他の試薬の容量.....	116
トラブルシュートガイド.....	117

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 mRNA 試薬キットは表 66 に示す試薬キットを使用します。表 66 で複数のキットから構成される製品の構成は、表 67 から表 70 に示します。

表 66 キットの構成

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit Part Number (96 Reaction Kits)
Standard Component Modules		
SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR)	+4°C	5190-6411
SureSelect cDNA Module (Pre PCR)	-20°C	5500-0149
SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	-20°C	5500-0151
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	-20°C	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)
Optional Component Modules		
SureSelect RNA AMPure® XP Beads	+4°C	5191-6671*

* 96 反応試薬キットの G9998A、G9998B、G9998C、G9998D にのみ含まれています。

表 67 SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR) の内容

Kit Component	96 Reaction Kit Format
Oligo(dT) Microparticles	bottle
Bead Binding Buffer	bottle
Bead Washing Buffer	bottle
Bead Elution Buffer	bottle

8 リファレンス

表 68 SureSelect cDNA Module (Pre PCR) の内容

Kit Component	96 Reaction Kit Format
2X Priming Buffer	tube with purple cap
First Strand Master Mix*	amber tube with amber cap
Second Strand Enzyme Mix	bottle
Second Strand Oligo Mix	tube with yellow cap

* First Strand Master Mix はアクチノマイシン D を含みます。光の暴露から守るため、提供されている琥珀色のチューブから移し替えないでください。

表 69 SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR) の内容

Kit Component	96 Reaction Kit 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
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5x Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

表 70 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR) の内容

Kit Component	96 Reaction Kit 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)

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、103 ページ表 72 から 110 ページ表 79 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、94 ページをご覧ください。

各プライマーのインデックス部分の塩基配列は、表 72 から表 79 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 71 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 71 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。

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。

8 リファレンス

表 72 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	TTCGGTAG	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	TCGTCGTG	TCTACCTC	GAGGTAGA
15	G02	TCTCAGCA	CTACAATG	CATTGTAG	39	G05	ATGAGAAC	TCGTCGTG	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	CAGTTCGA
21	E03	ATCCTCTT	CTTGATA	TATGCAAG	45	E06	TATTCCTG	CGCTTCCA	TGGAAGCG
22	F03	GCACCTAA	ATCCTCTT	AAGAGGAT	46	F06	CAAGTTAC	TATTCCTG	CAGGAATA
23	G03	TGCTGCTC	GCACCTAA	TTAGGTGC	47	G06	CAGAGCAG	CAAGTTAC	GTAACCTG
24	H03	TGGCACCA	TGCTGCTC	GAGCAGCA	48	H06	CGCGCAAT	CAGAGCAG	CTGCTCTG

表 73 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	TTCGTCAT	75	C10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D07	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	E07	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTCGCT	77	E10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	F07	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	F10	AAGAACCT	GCAATGAA	TTCATTGC
55	G07	GACTCAAT	GATCGCCT	AGGCGATC	79	G10	CTGTGCCT	AAGAACCT	AGGTTCCT
56	H07	CAGCTTGC	GACTCAAT	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	AGCTTGCC	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

8 リファレンス

表 74 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	ATTCGCTT	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	GTTGTCGA	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	GAATCAGA	142	F06	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	G03	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCCA	143	G06	CTTCACGT	GAATCGCA	TGCGATTTC
120	H03	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	H06	CTCCGTTT	CTTCACGT	ACGTGAAG

表 75 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	GTACTTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTCG
153	A08	CAATCCGA	CACATTCG	CGAATGTG	177	A11	TCGAAGGA	TGATTGGC	GCCAATCA
154	B08	CATCGACG	CAATCCGA	TCGGATTG	178	B11	CAGTCATT	TCGAAGGA	TCCTTCGA
155	C08	GTGCGCTT	CATCGACG	CGTCGATG	179	C11	CGCGAACA	CAGTCATT	AATGACTG
156	D08	ATAGCGTT	GTGCGCTT	AAGCGCAC	180	D11	TACGGTTG	CGCGAACA	TGTTCGCG
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	GAGTGCGT	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	ATCTTCCT	192	H12	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

8 リファレンス

表 76 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	AAGGTACT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GACTGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTACT	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	GTTCTTAA
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

表 77 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	TGCTCTTT	266	B10	CTTGATCA	CAATGCTG	CAGCATTG
243	C07	TCTGCTAC	TAGCTATG	CATAGCTA	267	C10	GCGAATTA	CTTGATCA	TGATCAAG
244	D07	GTCACAGA	TCTGCTAC	GTAGCAGA	268	D10	GTTGAGGC	GCGAATTA	TAATTCGC
245	E07	CGATTGAA	GTCACAGA	TCTGTGAC	269	E10	GCCAGTAG	GTTGAGGC	GCTCGAAC
246	F07	GAGAGATT	CGATTGAA	TTCAATCG	270	F10	AAGGTCGA	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

8 リファレンス

表 78 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	ATGTGCGAG	326	F05	AGGCTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGCTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAATCAC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAATCAC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GACTGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GACTGACG	CGTCAGTC	331	C06	AACTCACA	TGGAGACT	AGTCTCCA
308	D03	GAGTGTAG	CTTAAGAC	GTCTTAAG	332	D06	GTAGACTG	AACTCACA	TGTGAGTT
309	E03	TGCACATC	GAGTGTAG	CTACACTC	333	E06	CGTAGTTA	GTAGACTG	CAGTCTAC
310	F03	CGATGTCG	TGCACATC	GATGTGCA	334	F06	CGTCAGAT	CGTAGTTA	TAACTACG
311	G03	AACACCGA	CGATGTCG	CGACATCG	335	G06	AACGGTCA	CGTCAGAT	ATCTGACG
312	H03	GATCCATG	AACACCGA	TCGGTGTT	336	H06	GCCTTCAT	AACGGTCA	TGACCGTT

表 79 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	TAGTCAG
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	GTTCATT	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCATT	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	TACTGCT
348	D08	TACCGCAT	TTCCAACA	TGTTGGAA	372	D11	TCCTTGAG	ATTCCAGA	TCTGGAAT
349	E08	AGGCAATG	TACCGCAT	ATGCGGTA	373	E11	ATACCTAC	TCCTTGAG	CTCAAGGA
350	F08	GCCTCGTT	AGGCAATG	CATTGCCT	374	F11	AGACCATT	ATACCTAC	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	AACGTACT	379	C12	TGCGCTCT	GTCGCCTA	TAGGCGAC
356	D09	GTAGAGCA	AACGCTGC	GCAGCGTT	380	D12	GCTATAAG	TGCGCTCT	AGAGCGCA
357	E09	TCCTGAGA	GTAGAGCA	TGCTCTAC	381	E12	CAACAAC	GCTATAAG	CTTATAGC
358	F09	CTGAATAG	TCCTGAGA	TCTCAGGA	382	F12	AGAGAATC	CTCTACT	AGTGAGAG
359	G09	CAAGACTA	CTGAATAG	CTATTCAG	383	G12	TAATGGTC	AGACGAGC	GCTCGTCT
360	H09	GCACAGTA	CAAGACTA	TAGTCTTG	384	H12	GTTGTATC	TAATGGTC	GACCATTA

8 リファレンス

インデックスプライマーペアのプレートマップ

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアのプレートマップは 110 ページの表 79~112 ページの表 83 をご覧ください。

表 80 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 81 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

表 82 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 83 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 mRNA ライブラリ調製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。

RNA の断片化

表 84 Fragmentation_XT_HS2_RNA 用 Fragmentation マスターミックスソースプレート (50 ページ)

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
2X Priming Buffer (tube with purple cap)	Column 1 (A1-H1)	16.0 µL	27.0 µL	38.0 µL	49.0 µL	76.0 µL	145.0 µL

表 85 FirstStrandcDNA_XT_HS2_mRNA 用マスターミックスソースプレート (55 ページ)

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
First Strand Master Mix (amber tube with amber cap)	Column 2 (A2-H2)	9.0 µL	13.0 µL	17.0 µL	21.0 µL	29.0 µL	53.0 µL

表 86 Second Strand マスターミックスの調製 (59 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
Second Strand Enzyme Mix (bottle)	25 µL	265.6 µL	478.1 µL	690.6 µL	903.1 µL	1353.0 µL	2709.4 µL
Second Strand Oligo Mix (tube with yellow cap)	5 µL	53.1 µL	95.6 µL	138.1 µL	180.6 µL	270.6 µL	541.9 µL
Total Volume	30 µL	318.7 µL	573.7 µL	828.7 µL	1083.7 µL	1623.6 µL	3251.3 µL

表 87 SecondStrandcDNA_XT_HS2_RNA 用 Second Strand マスターミックスソースプレート (60 ページ)

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
Second Strand Master Mix	Column 3 (A3-H3)	36.0 µL	67.0 µL	98.0 µL	129.0 µL	196.0 µL	400.0 µL

ライブラリ調製

表 88 末端修復/dA 付加マスターミックスの調製(66 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 (bottle)	16 µL	204 µL	340 µL	476 µL	612 µL	936 µL	1944 µL
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (tube with orange cap)	4 µL	51 µL	85 µL	119 µL	153 µL	234 µL	486 µL
Total Volume	20 µL	255 µL	425 µL	595 µL	765 µL	1170 µL	2430 µL

表 89 ライゲーションマスターミックスの調製(67 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 (bottle)	23 µL	293.3 µL	488.8 µL	684.3 µL	879.8 µL	1407.6 µL	2834.9 µL
T4 DNA Ligase (tube with blue cap)	2 µL	25.5 µL	42.5 µL	59.5 µL	76.5 µL	122.4 µL	246.5 µL
Total Volume	25 µL	318.8 µL	531.3 µL	743.8 µL	956.3 µL	1530 µL	3081.4 µL

表 90 アダプター-Oligo Mix の希釈(68 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	151.4 µL	282.1 µL
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (tube with green cap)	5 µL	85.0 µL	127.5 µL	170.0 µL	212.5 µL	302.8 µL	564.2µL
Total Volume	7.5 µL	127.5 µL	191.3 µL	255.0 µL	318.8 µL	454.2 µL	846.3 µL

表 91 LibraryPrep_XT_HS2_ILM または LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM ランセット 用マスターミックスソースプレートの調製(74 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 4 (A4-H4)	31.0 µL	52.0 µL	73.0 µL	94.0 µL	140.0 µL	280.0 µL
Ligation master mix	Column 5 (A5-H5)	36.0 µL	62.0 µL	88.0 µL	114.0 µL	180.0 µL	366.5 µL
Adaptor Oligo Mix dilution	Column 6 (A6-H6)	15.0 µL	22.5 µL	30.0 µL	37.5 µL	56.3µL	105.0 µL

8 リファレンス

PCR

表 92 PCR マスターミックスの調製 (74 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 Buffer with dNTPs (tube with clear cap)	10 µL	170 µL	255 µL	340µL	425 µL	574 µL	1066 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (tube with 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

表 93 PCR_XT_HS2_ILM 用マスターミックスソースプレートの調製 (74 ページ)

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of master mix added per Well of Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
PCR Master Mix	Column 1 (A1-H1)	22 µL	33 µL	44 µL	55 µL	77 µL	143 µL

表 94 TS_D1000 用 Sample Buffer ソースプレートの調製 (81 ページ)

Solution	Position on Source Plate	Volume of Sample Buffer added per Well of Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
D1000 Sample Buffer	Column 2 (A2-H2)	11.0 µL	17.0 µL	23.0 µL	29.0 µL	41.0 µL	77.0 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 95 RNA インプット量と推奨のライブラリ調製ランセット

RIN of RNA sample	RNA input quantity	Library Preparation runset
>8	100 ng to 1 µg	LibraryPrep_XT_HS2_ILM
	10 ng to 100 ng	LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM
6–8	50 ng to 1 µg	LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM
<6	Not recommended for use	—

表 96 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 µL

表 97 AMPure XP プロトコルで使用する AMPure XP Beads の液量

Protocol or Runset	Volume of AMPure Beads per Well*
SecondStrand_XT_RNA	105 µL
LibraryPrep_XT_HS2_ILM	80 µL
LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM	80 µL and 60 µL
AMPureXP_XT_HS2_ILM (PCR)	50 µL

*AMPure XP Beads を自動化プログラムを用いて分注する際には、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。

表 98 AMPure XP プロトコル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 (or 100 mL for the LibraryPrep_LILQ_XT_HS2_ILM runset)
Nuclease-free water in Agilent shallow well reservoir	30 mL

トラブルシュートガイド

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 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。
- ✓ 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。
- ✓ ライブラリ DNA を高感度のアッセイで分析し、濃度を決定してください。お使いのプラットフォームでの高感度 DNA 解析キットについては、agilent.com の自動電気泳動ページをご覧ください。

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。

得られたライブラリの 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。84 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、そのまま進んでも問題ありません。過剰なアダプターダイマーが含まれていると、ライブラリの収量が低下する可能性があります。

G230532

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。