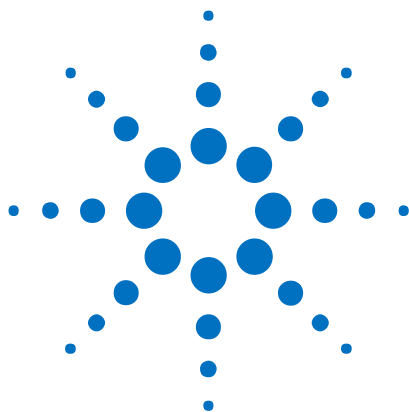




SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation Kit



和文プロトコル

Protocol Version A0 対応

[2018 年 11 月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した

SureSelect プラットフォーム

Research Use Only.

Not for use in Diagnostic Procedures.

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、使用プロトコルについて、弊社までお問い合わせいただきますようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の SureSelet XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation Kit Version A0, September 2018 [G9702-90050] に対応しています。

本ドキュメントは、SureSelect XT HS Reagent Kit または SureSelect XT Low Input Reagent Kit を用いて次世代シーケンス (NGS) のためのライブラリを調製する前に、gDNA サンプルを機械の代わりに酵素で断片化するのに最適化されたプロトコルを記載しています。

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

email_japan@agilent.com

1. はじめに

2. 酵素による DNA 断片化プロトコル

3. リファレンス

内容

1. はじめに	4
プロトコル概要	5
操作に関する注意	6
安全に関する注意	6
実験に必要な試薬	7
実験に必要な装置、消耗品類	7
2. 酵素による DNA 断片化プロトコル	8
STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認	9
STEP2. DNA の酵素による断片化	12
3. リファレンス	13
キット内容	14
トラブルシューティングガイド	15



1. はじめに

プロトコル概要 5

操作に関する注意 6

安全に関する注意 6

実験に必要な試薬 7

実験に必要な装置、消耗品類 7

最新のプロトコルを参照してください。

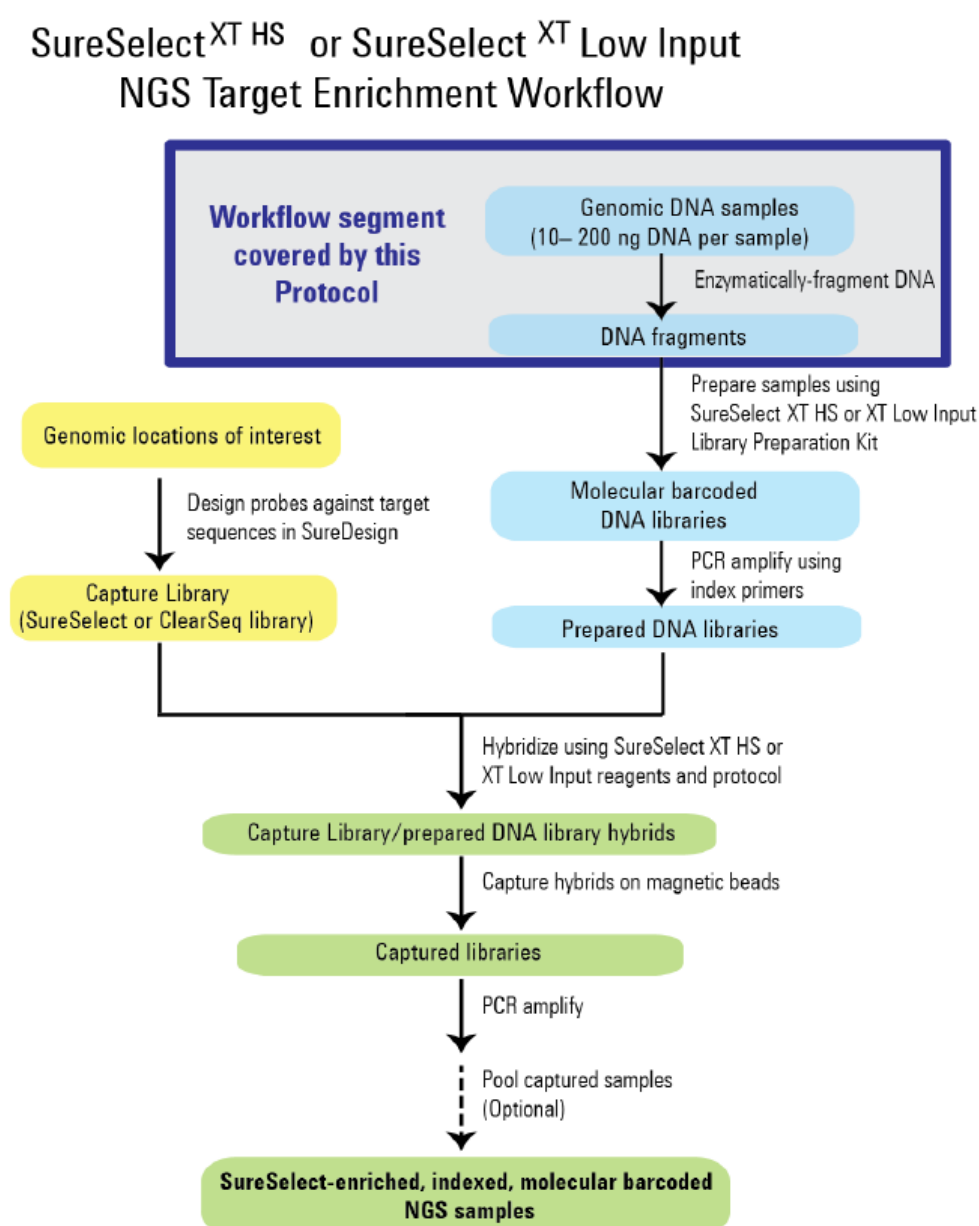
実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

プロトコル概要

SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントのワークフローの概要を図 1 に示します。図には、本プロトコルに記載されているワークフロー部分が、四角で囲まれて示されています。その他のワークフローについては、SureSelect XT HS ターゲットエンリッチシステムまたは SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムをご覧ください。

このプロトコルに示す、酵素による断片化は、シーケンスライブラリの調製とターゲットエンリッチメントの前の機械による断片化の代わりに使用できます。

図 1 ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー



操作に関する注意

- ・ 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下さい。
 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 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。

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

表 1 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
下記のいずれかをご準備ください					
SureSelect XT HS Enzymatic Fragmentation キット、イルミナ、16反応	Agilent	5191-4079	指定	16反応分	
SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentationキット、イルミナ、96反応	Agilent	5191-4080	指定	96反応分	
その他の試薬					
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850	指定	100 assay	スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。大容量タイプ(500 assays [Q32853])もあります。
(FFPEサンプルのときのみ)DNA調製および解析用の試薬					
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)	指定	16反応分 または 96反応分	FFPE由来DNAサンプルの場合、ゲノムDNA QCIに使用します。
Genomic DNA Screen Tape	Agilent	5067-5365	指定	7枚	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 Samples	Qiagen	56404	指定		
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		

実験に必要な装置、消耗品類

表 2 必要な機器、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
(FFPEサンプルのときのみ)DNA解析用の電気泳動装置					
Agilent 4200 TapeStation System*	Agilent	G2991AA	指定		DNAの定性・定量に使用することができます。Agilent 2200 TapeStationの使用も可能です。
その他					
SureCycler 8800 サーマルサイクラ	Agilent	G8800A	相当		HotTop使用
96 well plate module for SureCycler 8800 サーマルサイクラ	Agilent	G8810A	相当		
SureCycler 8800 compatible plasticware : 96-well tube plates または optical strip tubes	Agilent	410088 または 410092	相当	PCR Plate 25プレート Strip Tubes 120本	
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当	strip caps 120本	
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンダウン用。卓上遠心機でも可能。(例: 日本ミリポア チビタンII)
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)
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	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					
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		
アيس/バケツ					
タイマー					
ボルテックスミキサ					

* これ以外に定量PCRによる品質確認の方法もあります。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

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

また、それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。



2. 酵素による DNA 断片化プロトコル

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認 9

STEP2. DNA の酵素による断片化の酵素による断片化 12

本プロトコルは SureSelect XT HS システムまたは SureSelect XT Low Input システムにて次世代シーケンス(NGS)ライブラリを調製する前に、gDNA サンプルを酵素で断片化する工程において使用します。酵素による DNA の断片化は SureSelect XT HS ターゲットエンリッチメントシステムまたは SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムのマニュアルに記載されている機械による断片化の代わりとして用いることを想定しています。NGS ライブラリ調製ワークフローについては p.5 の図1をご覧ください。

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認

ライブラリ調製のプロトコルには 10 ng~200 ng のスタート gDNA が必要です。酵素で断片化するときの始めの DNA サンプルの容量は 7 μ L です。

以下に示すように、FFPE サンプルの場合、DNA のスタート量または定量法を調整する必要があります。最適なシーケンス結果を得るために、インプット DNA は推奨量の範囲内であるべく多い量を使用してください。

Fresh なサンプルからの高品質 gDNA の調製

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

NOTE

gDNA サンプルが、OD260/280 の値が 1.8~2.0 であり高品質であることを確認してください。

2. Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。
3. 各 DNA サンプルを 10 ng~200 ng ずつ、PCR プレートのウェルまたは strip tube に入れ、nuclease-free 水で 7 μ L の容量になるように調製します。ボルテクスミキサでよく混合し、軽く遠心し液を容器の底に集めます。サンプルは氷上に置きます。

Fresh なサンプルから調製した DNA は、その後更なる品質確認操作は不要です。p. 12 の「STEP2. DNA の酵素による断片化」に進みます。

FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認

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

NOTE

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

同じ日にライブラリ調製を行う場合は、精製後の gDNA は氷上に置きます。

ライブラリ調製が後日になる場合は、-20°C に保存します。

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

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

Agilent NGS FFPE DNA QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を定めることができます。 $\Delta\Delta Cq$ 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨内容は表 3 をご覧ください。

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

表 3 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

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

* $\Delta\Delta Cq$ が 1 以下の FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。

10~200 ng に必要な容量を計算するには qPCR による DNA 濃度ではなく、Qubit で測定した濃度を使用します。

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

Agilent 4200 TapeStation を用いて Genomic DNA ScreenTape Assay を行い、電気泳動パターンから DNA サンプルの分解度を調べます。このアッセイでは、各サンプルについて DNA Integrity Number (DIN) の値が出力され、低品質 DNA の場合はその値をもとに DNA インプット量を決定します。

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μ L を Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay 用に分注します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- DIN の値をもとに、表 4 の内容を参照にして各サンプルのインプット量を決定してください。

表 4 DNA Integrity Number (DIN) の値に基づく、SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

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

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

- PCR プレートの well もしくは strip tube に、それぞれ定量した DNA サンプルを、推奨内容に従った量入れます。容量は 7 μ L にします。p.12 の step 4 で使用するまで、サンプルは氷上に置きます。

NOTE

必要に応じて、使用する DNA サンプルを Nuclease-free 水で希釈し容量を 7 μ L にするか、適切な濃縮方法を用いて容量を 7 μ L にしてください。

FFPE サンプルの使用 DNA 量については、上記表 3 もしくは表 4 に示された DNA の品質に基づいたガイドラインを参照してください。

STEP2. DNA の酵素による断片化

1. 作業を始める前に、5X SureSelect Fragmentation Buffer を溶解しボルテックスミキサで混合し、氷上に置きます。
2. サーマルサイクラのプログラムを表 5 の内容に設定します (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、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 5 サーマルサイクラプログラム*

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	15 minutes
Step 2	65°C	5 minutes
Step 3	4°C	Hold

* サーマルサイクルプログラムでの反応量は 10 µL に設定してください。

3. 表 6 の試薬を混合し、適切な量の Fragmentation master mix を調製します。ピペッティングを 20 回繰り返しよく混合します。混合後、チューブを軽く遠心し泡を消し、液を底に集め、氷上に置きます。

表 6 Fragmentation master mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)
5X SureSelect Fragmentation Buffer	2 µl	18 µl
SureSelect Fragmentation Enzyme	1 µl	9 µl
Total	3 µl	27 µl

4. 7 µL の DNA の入った各サンプル well または tube に、Fragmentation master mix 3 µL 加えます。
5. ピペッティングを 20 回繰り返し、よく混合します。Well もしくは tube に蓋をし、軽く遠心します。
6. すぐにプレートもしくは strip tube をサーマルサイクラにいます。Play ボタンをおし、表 5 の通り設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します。
7. サーマルサイクラが 4°C Hold のステップになったら、サンプルをサーマルサイクラから出し、各サンプルに Nuclease-free 水を 40 µL 加えます。サンプルを氷上に置きます。

NGS シーケンスライブラリ調製に用いる 50 µL の反応液の調製が完了しました。SureSelect XT HS ターゲットエンリッチメントシステムもしくは SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムの「STEP 3 末端修復と dA 付加」の工程に直接進んでください。

NOTE

ここは Stopping Point ではありません。ライブラリ調製の工程に入る前に、酵素で断片化したサンプルの確認を行う必要はありません。「末端修復と dA 付加」の工程に進んでください。



3. リファレンス

キット内容 14

トラブルシュートガイド 15

この章では、キットに含まれている試薬内容、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について記載しています。

キット内容

本ユーザマニュアルでサポートする Enzymatic Fragmentation キットには以下の表7の内容が含まれています。

表 7 キット内容

Component	Format
5X SureSelect Fragmentation Buffer	Tube with blue cap
SureSelect Fragmentation Enzyme	Tube with green cap

トラブルシュートガイド

サンプルから DNA 精製する時に DNA の収量が少ない

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

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より異なる

- ✓ サンプルの品質確認を酵素断片化の後ではなく、プロトコルの内容に従ったステップで実施していることを確認してください。DNA の断片化後のサイズについては、SureSelect XT HS ターゲットエンリッチメントシステムまたは SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムのマニュアルに記載されているとおり、4200 TapeStation か 2100 Bioanalyzer を用いてキャプチャ前の増幅の後に最初に行われます。
- ✓ 酵素断片化反応が下記の条件で実施されていることを確認してください。
 - 最初の DNA 量が 10-200 ng である。
 - 断片化の条件は 37°C 15 分である。
 - SureSelect Fragmentation Enzyme 1 µL と 5X SureSelect Fragmentation Buffer 2 µL を最終容量 10 µL で使用している。
- ✓ DNA の断片化が不十分の場合は、検体 DNA サンプル中に断片化反応を阻害するものが含まれていないことを確認するために、コントロール DNA サンプルを用いて、再度実験を試されることをご検討ください。

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

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

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万が一不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。

* 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。