

アジレント

SureSelect<sup>XT</sup>

**Methyl-Seq** ターゲット

エンリッチメントシステム

イルミナマルチプレックス

シーケンス対応キット

(p/n **5500-0128** もしくは **5500-0129** の

ライブラリ調製キット対応)

**和文プロトコル**

Protocol Version C.0 対応

[2015 年 1 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

Protocol

SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq Target Enrichment System

for Illumina Multiplexed Sequencing

Version C.0, January 2015

G7530-90002

に対応していますが、一部最新情報を元に改訂しています。本バージョンについての英文、和文の記載の違いについては、和文プロトコルを参照ください。

このプロトコルでは、アジレント SureSelect Target Enrichment System のサンプル調製キットを用い、DNA メチル化解析のためのイルミナペアエンドマルチプレックスシーケンシング用バイサルファイト変換サンプルを調製するために最適化された操作手順を記述しています。

このプロトコルは、イルミナ社マルチプレックスペアエンドシーケンス対応用の **SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq** キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。メチル化解析用ではない **SureSelect** キットには対応していませんので、ご注意ください。

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

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

## 1. はじめに

この章では、実験をはじめる前に読む必要がある情報(安全上の注意点、必要な試薬や機器など)について説明しています。必ず実験前にお読みください。

## 2. サンプル調製 (3 ug DNA サンプル)

この章では、3  $\mu$ g の gDNA から、ターゲットエンリッチメントに用いる DNA ライブラリを調製するステップについて説明しています。

## 3. サンプル調製 (1 ug DNA サンプル)

この章では、3  $\mu$ g の gDNA から、ターゲットエンリッチメントに用いる DNA ライブラリを調製するステップについて説明しています。

## 4. ハイブリダイゼーション

この章では、SureSelect<sup>XT</sup> Human Methyl-Seq Capture Library を用いて gDNA ライブラリをハイブリダイゼーションし、キャプチャするステップについて説明しています。

## 5. バイサルファイト変換反応

この章では、メチル化されたシトシンと非メチル化シトシンを区別するために、キャプチャされた DNA ライブラリのバイサルファイト処理を行うステップについて説明しています。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

この章では、バイサルファイト処理で修飾された DNA ライブラリにインデックスタグを付加し、マルチプレックスシーケンシングのためにプールするステップについて説明しています。

## 7. リファレンス

この章では、本実験に用いる装置や消耗品の付加的な注意点について説明しています。

## これまでのバージョンでの変更点

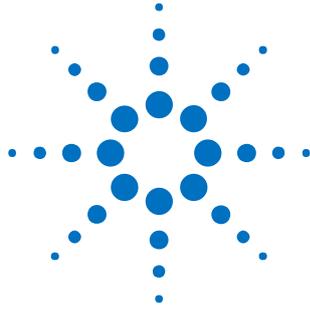
### Ver C での変更点

- ・2015年1月の下旬から、従来の6 bpのインデックスに変わり、新しい8 bpのインデックスが添付されるようになりました。
- ・8 bpのインデックスは、16反应用 (A01-H02)は白いキャップのチューブ(従来の6 bpは透明キャップのチューブ)、96反应用 (A01-H12)は、青い96 well plate(従来の6 bpは、透明キャップのチューブ)に入っています。インデックス試薬の詳細および8 bpのインデックスの配列については、プロトコル末尾のリファレンスを参照ください。
- ・従来品の6 bpのインデックス試薬は、16反应用、96反应用ともに透明キャップのチューブに入っています。使用するインデックス試薬を事前によく確認のうえ、適切なプロトコルをご使用ください。本プロトコルは従来品の6 bpのインデックス試薬を含む試薬キットには対応していませんので、ご注意ください。従来の6 bpのインデックス試薬を含む試薬キットを使用する場合は、Version B.1 [2014年8月版 和文]を参照してください。
- ・インデックス試薬の変更に伴い、ライブラリ調製用のマスターミックス試薬も、個々の酵素とバッファなどの構成試薬に分かれました。本プロトコルは、この新しいライブラリ調製試薬(個別タイプ)に対応しています。従来のマスターミックスタイプのライブラリ調製試薬を使用する場合は、Version B.1 [2014年8月版 和文]を参照してください。
- ・1 ugのスタート量に対応するプロトコルが追加されました。
- ・ハイブリダイゼーションのプロトコルが変更されました。
  - 1) ハイブリダイゼーションに必要なライブラリの最小量が、350 ngになりました。
  - 2) ハイブリダイゼーション時間が、16時間になりました。
  - 3) ハイブリダイゼーションのセットアップの方法が変わりました。この変更は、ハイブリダイゼーション溶液の最終的な組成には影響していませんが、使用する液量と、調製するステップが変更になっています。
- ・シーケンシングのためのガイドラインが Update されました。

## 目次

<b>1. はじめに</b> .....	<b>7</b>
操作に関する注意 .....	8
安全に関する注意 .....	8
実験に必要な試薬 .....	9
実験に必要な装置、消耗品類 .....	11
<b>2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)</b> .....	<b>13</b>
STEP1. DNA の断片化 .....	16
STEP2. 末端修復 .....	19
STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	21
STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質 (サイズ) チェック .....	23
STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化 .....	25
STEP6. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	26
STEP7. メチル化用アダプターライゲーション .....	28
STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	29
STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation による DNA サンプルのサイズチェック と定量 .....	30
<b>3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル)</b> .....	<b>33</b>
STEP1. DNA の断片化 .....	35
STEP2. 末端修復 .....	38
STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	40
STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質 (サイズ) チェック .....	42
STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化 .....	44
STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	45
STEP7. メチル化用アダプターライゲーション .....	46
STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	47
STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による DNA サンプルのサイズチェックと 定量 .....	48
<b>4. ハイブリダイゼーション</b> .....	<b>51</b>
STEP1. ハイブリダイゼーション .....	52
STEP2. 磁気ビーズの調製 .....	57
STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 .....	58
<b>5. バイサルファイト変換反応</b> .....	<b>61</b>
STEP1. キャプチャされた DNA のバイサルファイト変換処理 .....	62
STEP2. バイサルファイト処理ライブラリの PCR 増幅 .....	64
STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 .....	66

<b>6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール</b>	<b>68</b>
STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加	69
STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製	71
STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation によるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認	73
STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール	76
STEP5. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation によるインデックス付き DNA プールの定量とサイズ確認	77
シーケンスランセットアップのためのガイドライン	78
<b>7. リファレンス</b>	<b>79</b>
試薬一覧	80
Methyl-Seq データ解析について	84



## 1. はじめに

- 操作に関する注意 8
- 安全に関する注意 8
- 実験に必要な試薬 9
- 実験に必要な装置、消耗品類 11

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。

### CAUTION

本プロトコルは、p/n **5500-0128** もしくは **5500-0129** (2015 年 1 月下旬以降の出荷) の番号が付いたライブラリ調製キットに対応しています。必ず、ご使用前に、ライブラリ調製キットに貼られたラベルの番号を確認ください。

お手持ちのライブラリ調製キットの部品番号が **5500-0107** もしくは **5500-0108** の場合は、**本プロトコルではなく、Version B.1 [2014 年 8 月版 和文]**を参照してください。これらのキットは、試薬が異なるため、本プロトコルを参照いただくことができません。

### NOTE

Target Enrichment Kit を本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となります点、ご了承ください。

### NOTE

ベックマン・コールター社製の精製ビーズについては、必ずベックマン・コールター社のユーザーズガイドをあわせて参照ください。

### NOTE

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

## 1. はじめに

### 操作に関する注意

- SureSelect Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。もし長時間空気にさらしてしまった場合は、使用前に pH 試験紙で pH が 12.5～13.5 の間であることを確認してください。pH が 12 以下になると、収量が下がるおそれがあるので、絶対に使用せず、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）。
- 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。
- 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- gDNA を含む溶液は、Vortex で混合しないようにしてください。指でそっとタッピングすることで、液を混合するようにしてください。
- gDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けるようにしてください。gDNA サンプルは、本プロトコル中の **stopping point** と表示がある箇所を実験を中断し、4°C で一晩保存することが可能です。24 時間以上保存する際には、サンプルは-20°C で保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 凍結しているストック溶液を使用する際には次のステップで行います。
  1. 室温以上の温度で加熱しないように、かつできるだけ速く分注された溶液を融かします。
  2. Vortex Mixer で軽く短時間混ぜ、遠心機で 5～10 秒遠心して、チューブの壁やふたについた液を落とします。
  3. 使用時までオンアイスまたは冷却ブロックの中で保存します。
- Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

### 安全に関する注意

#### CAUTION

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

## 実験に必要な試薬

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

<http://agilentgenomics.jp>

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 1 実験に必要な試薬

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量/ 1反応 あたり	内容量	備考
<b>SureSelect 試薬キット</b>						
SureSelect XT Methyl-Seq Reagent Kit, 16 reactions	Agilent	G9651A	-	1	16反応分	
SureSelect XT Methyl-Seq Reagent Kit, 96 reactions	Agilent	G9651B	-	1	96反応分	
<b>SureSelect XT キャプチャライブラリ(バイト)キット</b>						
SureSelect XT Human Methyl-Seq Capture Library, 16 reactions	Agilent	5190-4661	-	1	16反応分	
SureSelect XT Human Methyl-Seq Capture Library, 96 reactions	Agilent	5190-4662	-	1	96反応分	
SureSelect XT Mouse Methyl-Seq Capture Library, 16 reactions	Agilent	アーリーアクセス	-	1	16反応分	
SureSelect XT Mouse Methyl-Seq Capture Library, 96 reactions	Agilent	アーリーアクセス	-	1	96反応分	
SureSelect XT Rat Methyl-Seq Capture Library, 16 reactions	Agilent	アーリーアクセス	-	1	16反応分	
SureSelect XT Rat Methyl-Seq Capture Library, 96 reactions	Agilent	アーリーアクセス	-	1	96反応分	
<b>その他の試薬</b>						
EZ-DNA Methylation-Gold Kit, 50 reactions	Zymo Research	D5005	指定	1	50反応分	50反応分です。 (200反応分もあります。D5006)
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	510 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当	約 50 uL	100 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約 230 uL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	和光純薬工業	054-07225	相当	約 6 mL	500mL	96%以上、分子生物学用グレード 他の有機溶剤のコンタミネーションがないこと
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade					2.8 mL	
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	推奨		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。
※お持ちの電気泳動装置に同じ、TapeStation用もしくはバイオアナライザ用、いずれかの消耗品をご用意下さい。						
<b>Agilent 2200 TapeStation消耗品</b>						
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	1ラン		
Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape	Agilent	5067-5365	推奨	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Agilent TapeStation Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	推奨	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。
<b>Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品</b>						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	2 ラン	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	2 ラン	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。エキスパートソフトウェアVer B02.07以降が必要です。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
Agilent QPCR NGSライブラリ定量キット(イルミナGA)	Agilent	G4880A	推奨	1ラン	5ラン分	バイサルファイト変換後のライブラリの定量に使用します。この定量値により次のPCRのサイクル数を決定します。1ランで最大21サンプルまで定量することができます。

## 1. はじめに

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

### ※【試薬・消耗品の保証期間について】

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

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するよう計画して下さい。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存ください。

※SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(Bait)とライブラリ調製キットは 16 反応分、96 反応分、もしくは 480 反応分がキット単位となっています。

## 実験に必要な装置、消耗品類

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

<http://agilentgenomics.jp>

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 2 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量		備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。						
Agilent 2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA または G2965AA	指定			キャプチャ前後のDNAライブラリの定量と サイズ確認に必要です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定			キャプチャ前後のDNAライブラリの定量とサ イズ確認に必要です。Expert Control Software B.02.07以降のversionであること。
SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8800A	推奨			反応液量の最大値が100uLに対応している こと、ふた(Hot Top)の温度をオフに出来ること。
96 well plate module for SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8810A	推奨			
Polypropylene 96-Well Tube Plates もしくは 8-well strip tubes	Agilent	410088 (plate) or 410092 (strip tubes)	推奨		25 plates	SureCycler 8800 対応96Wellプレートを使用 してAMPureXP精製を行う場合、最大280uLの 容量が入ること。
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	推奨	1本	strip caps 120本	410187 コンプレッションマットと組み合わせて ハイブリダイゼーションに使うキャップ。溶液の 蒸発を防止します。
コンプレッション・マット	Agilent	410187	推奨	1枚	10枚	410096 domed capと組み合わせて ハイブリダイゼーションに使うコンプレッション・ マット。溶液の蒸発を防止します。
Tube-strip capping tool			相当			PCRチューブのキャップを確実に密閉するた めに便利なツールです。
Covaris Sample Preparation System, E-series	Covaris (エムエス 機器)	Model S220 or E220 or LE220	指定			gDNAを再現性良く断片化するために必要。 ネプライザの使用は推奨しません。 S220はマニュアルで1検体ずつの処理。E210 は96検体を自動処理できるが、1検体ずつの 処理。LE220は96検体を自動処理できるが、8 検体ずつの処理 (E210より8倍処理速度が上 がる)。LE220はS2やE210と断片化のプロトコ ルが異なるので要注意。
Covaris S-series sample holders, microTUBE with AFA fiber and snap cap	Covaris (エムエス 機器)	520045	指定			Model S220用
Covaris E-series sample holders, 96 microTUBE plate	Covaris (エムエス 機器)	520078	指定			Model E210用
Qubit®2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨			スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量す るために用います。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために 用います。
遠心分離機	Eppendorf	5804	相当			
旋回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV- 03	相当			磁気ビーズ溶液がチューブを上下してよく混ざ るように、旋回運動をするタイプのもの。別売 りの専用チューブラック (WEB-03-12) と 組み合わせると便利。
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当			45°C以下の低温で、50uLのDNA溶液 (EB/バ ッファ溶液) が1~2時間程度で濃縮できること。 専用ロータ、冷却トラップTU-500と 油回転真空ポンプGLD-051が必要です。
ビーズ分離用マグネット： 日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用) または Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート、8連チューブ兼用)	日本ジェネ ティクス また は Life Technologies	8連チューブ用 FG-SSMAG2, 96ウェルプレ ート用 12331D	相当			8連チューブで実験をする場合、8連チューブが 独立して固定できるもの (日本ジェネティクス FG-SSMAG2など) 96ウェルプレート用マグネットはリング状に磁 性ビーズが集まるタイプではなくウェルの一方 に磁性ビーズが集まるタイプを推奨。
Dynal DynaMag-2	Life Technologies	123-21D	相当			1.5mLのチューブを使用するAMPureXPビー ズによる精製およびStreptavidinビーズの洗浄 に使用します。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	4306311	相当	4枚	100 films	サーマルサイクラーの機種によっては、Strip キャップのかわりにシールを用いることもでき ますが、より液が蒸発しやすくなる場合がある ので、使用には十分な注意とテストが必要で す。65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以 下まで蒸発しないこと。HotTop対応のこと。 Stripキャップを使用する場合は、不要です。

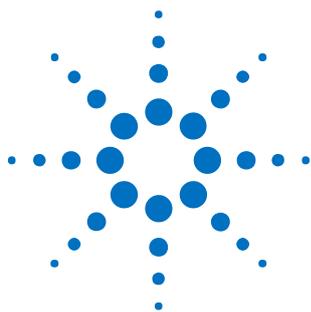
## 1. はじめに

表 2 実験に必要な装置、消耗品類 (続き)

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量	備考
Nuclease Free 1.5 mL microfuge LoBind tubes	Eppendorf	022431021	相当	500本	核酸の吸着が少なく、且つNuclease Freeであるもの。
ピペット	Pipetman	P10,P20,P200, P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体に対して同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアロゾルブロックフィルター付き					
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当		
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		
アイスバケツ					
タイマー					
ボルテックスミキサー					
卓上遠心器	日本ミリポア	テビタンII	相当		
ヒートブロック(37°C)、1.5mLのチューブが入るタイプ					AM Pure XPビーズによる精製ステップで使します。
ウォータバス(WashBuffer2のPreWarm 65°C)			相当		
オプション品となります。必要に応じてご利用ください					
Mx3005P リアルタイム定量PCRシステム	Agilent	401449	相当		キャプチャされたDNAライブラリを正確に定量するために用います。

※gDNA をロスなく再現性よく、かつ確実に 150-200 bp の長さに断片化するために、Covaris の ModelS220 または E シリーズの使用が指定されています。ネブラライザの使用は推奨しません。Covaris の詳細については、エムエス機器株式会社にお問い合わせください。

※磁気ビーズによる精製に用いるマグネットは、ご使用になるチューブの種類(1.5 mL チューブ、8 Strip PCR Tube または 96 well plate)により異なります。使用する予定のチューブの種類に適合したマグネットを選択してお使いください。



## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP1. DNA の断片化 16

STEP2. 末端修復 19

STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 21

STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質  
(サイズ)チェック 23

STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化 25

によるサンプルの精製 26

STEP7. メチル化用アダプターライゲーション 28

STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 29

STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation による DNA  
サンプルのサイズチェックと定量 30

## STEP7. メチル化用アダプターライゲーション

この章では、イルミナ社のシーケンスプラットフォームを用いて、3 ug の gDNA から、メチル化シトシンを解析するためのターゲットエンリッチメントに使用する gDNA ライブラリを調製する方法を説明します。

SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq の操作の概略は図 1 をご覧ください。

また 1 ug の gDNA から実験を行いたい場合は、3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル) からの章をご参照ください。

イルミナ社のオリジナルプロトコルとは、下記に加え、PCR の条件などが異なりますのでご注意ください。

1. コバリスを用いて、150-200 bp をターゲットサイズとした gDNA の断片化を行います。
2. 各ステップでの DNA の精製は、ベックマン・コールター社のビーズを使って行います。断片化サイズは、SureSelect のハイブリダイゼーションの効率に大きな影響を与えるため、gDNA の断片化について、コバリス以外の手法はバリデーションされていません。特にインデックスカスタムキットのプロトコルでは、ゲルによる精製とサイズ選択の代わりに、ビーズを使った核酸精製を行いますので、コバリスで gDNA を確実に断片化することが重要なポイントです。他の手法を使用した場合、保証およびサポートの対象外となります。

# SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq Target Enrichment Workflow

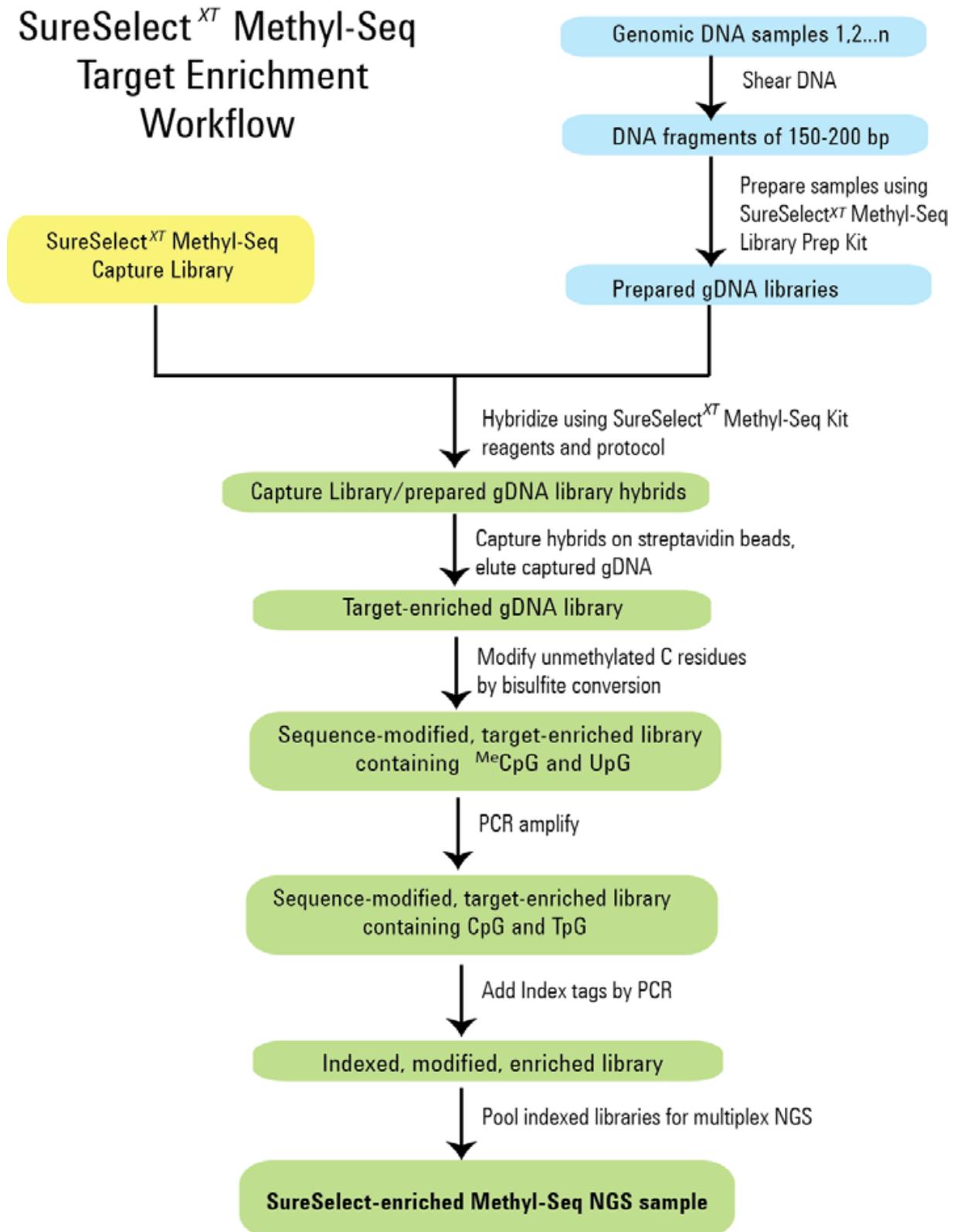


図 1 サンプル調製ワークフロー

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

### STEP1. DNA の断片化

Agilent SureSelect gDNA Extraction Kit でゲノム DNA を抽出することができます。gDNA Extraction Kit Protocol (p/n 5012-8701) を参照してください。

#### NOTE

実験には、OD260/280 の比が 1.8~2.0 の間にある高品質の gDNA を使用ください。できるだけ正確に DNA を定量するために、Qubit システムの使用をお勧めします。

マルチプレックスシーケンスを行う DNA のサンプルごとに、1つのメチル化アダプター付加ライブラリを調製します。16 サンプルをシーケンスする場合は、16 ライブラリを調製することになります。

1. Qubit dsDNA BR Assay キットを用いて、gDNA の濃度を測定します。  
Qubit のマニュアルにしたがって定量を行ってください。
2. 1.5 mL の LoBind のチューブを用いて、Qubit で定量した gDNA 3 µg を 1x Low TE Buffer で 50 µL になるように溶解します。Methyl-Seq のプロトコルでは、PCR 増幅なしにキャプチャを実施するため、3 ug のスタート量が必要です。量が少ないと、サンプルの複雑性が減少して、シーケンス結果に悪影響を与えるので、ご注意ください。
3. コバリスを起動します。起動してから脱ガスが完了するまで、30分程度かかります。またこの段階で次に使用する AMPure XP ビーズを室温に戻しておくくと便利です。
  - a. コバリスのウォーターバス内に、Milli-Q 水もしくは脱イオン水を注ぎます。水位は機種と使用しているチューブやプレートのタイプによって異なるため、コバリスの取り扱い説明書に沿ってください。
  - b. コバリスのウォーターバスの水位を、マイクロチューブ (p/n 520045) のキャップより下面のガラスチューブ全体が浸かるように調整してください。
  - c. コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C ~5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
  - d. (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20%[v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。
  - e. ソフトウェアのメインスクリーンから、DEGAS ボタンをクリックして、最低 30 分間 DEGAS を実行してください。  
コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。
4. マイクロチューブを、ローディングステーションの上に載せます。キャップがされた状態であることを確認してください。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

5. 先がテーパ状になったピペットチップを用い、コバリスのマイクロチューブのキャップ上面にあるスリットにチップの先を差し込んで、サンプルの全量 (50  $\mu$ L) を入れます。マイクロチューブ内に泡が残らないように注意してください。(泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します。) 必ず Covaris 社指定のマイクロチューブを使用してください。
6. サンプルを入れたマイクロチューブを、コバリスのマイクロチューブホルダーにセットします。表 3 の設定により、gDNA の断片化を行います。ターゲットピークサイズは 150-200 bp です。

表 3 コバリス (SonoLab バージョン 7 以降)

Setting	Value
Duty Factor	10%
Peak Incident Power (PIP)	175
Cycles per Burst	200
Treatment Time	360 seconds
Bath Temperature	4° to 8° C

コバリス (SonoLab バージョン 7 より前)

Setting	Value
Duty Cycle	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
Time	6 cycles of 60 seconds each
Set Mode	Frequency sweeping
Temperature	4° to 7° C

7. 断片化が終了したら、コバリスマイクロチューブをマイクロチューブホルダーから取り出し、ローディングステーションの上に再度載せます。
8. マイクロチューブのふたはそのままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、中のサンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
9. 断片化されたサンプル 48  $\mu$ L を新しい 96 ウェルプレート、もしくは Strip チューブに移します。96 ウェルプレートもしくは Strip Tube は、280  $\mu$ L 以上の液量が入るものを使用してください。またここで使用するチューブの種類により、この後のビーズ精製に必要なマグネットの種類が変わりますのでご注意ください。
10. **オプション** この時点での DNA サンプルの品質(サイズ)と量を、バイオアナライザの DNA1000 Assay もしくは、TapeStation の D1000 assay で確認することが可能です。手法については、

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP4 の章をご参照ください。ここで断片化 DNA を測定した場合は、100-175 bp の間にピーク  
トップがあることを確認します。また、定量を行い、定量値が 60 ng/uL (収量 3,000 ng) に近い値で  
あることを確認してください。総量が 2,000 ng 以下の場合、結果に悪影響を与える可能性がありま  
す。スタート量を増やすことができないか、再検討する必要があります。

## STEP2. 末端修復

**CAUTION**

キットに含まれている試薬のチューブやボトルは、使用直前に氷上で溶解して下さい。各サンプルに分注する前に、ボルテックスのスピードを高速に設定し、5 秒から 15 秒かけてマスターミックスのチューブやボトルをボルテックス上で混合して下さい。卓上遠心器でスピンドウンして液をチューブやボトルの底に集め、必要な液量を取り分けて各サンプルに分注して下さい。この混合ステップは、使用直前に行ってください。前もって試薬を融解・混合しないで下さい。

粘性が高い試薬があるため、取り分けた試薬が全量サンプルに添加され、ピペットチップの先には液が残っていないことを確認して下さい。サンプルとマスターミックスはボルテックスか 10 回のピペッティングで完全に均一にして下さい。

マスターミックスを完全に混合できていない場合、結果に悪影響を与える可能性があります。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)

表 4 に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 4 エンドリペアミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	35.2 $\mu$ L	580.8 $\mu$ L
10 $\times$ End Repair Buffer (clear cap)	10 $\mu$ L	165 $\mu$ L
dNTP Mix (green cap)	1.6 $\mu$ L	26.4 $\mu$ L
T4 DNA Polymerase (purple cap)	1 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
Klenow DNA Polymerase (yellow cap)	2 $\mu$ L	33 $\mu$ L
T4 Polynucleotide Kinase (orange cap)	2.2 $\mu$ L	36.3 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>52 <math>\mu</math>L</b>	<b>858 <math>\mu</math>L</b>

2. DNA サンプル 48  $\mu$ L が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製した エンドリペアミックスを 52  $\mu$ L ずつ加えます。ボルテックスミキサを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

- サーマルサイクラを使い、20°Cで 30 分間インキュベートします。サーマルサイクラの heated lid(ふた)は加熱しないように注意してください。

インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 5 末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

## STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 1 サンプルあたり 400ul(+余剰分)(1.5 mL のチューブを用いる場合は 1 ml +余剰分)の 70% エタノールを用時調製します。

## NOTE

同じ日に実施する別のステップの精製のための 70% エタノールを、ここで一緒に調製してきっちり密封して置いておくことは出来ませんが、エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、調製済み 70% エタノールはその日のうちに使い切ることを推奨します。

サンプル調製のステップでは、1 サンプルあたり 1.2 ml (1.5 mL のチューブを用いる場合は 3 ml) +余剰分の 70% エタノールが必要です。

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 前項の STEP2 で調製した末端修復後の DNA サンプル 100 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、注意して加えます。液がチューブほぼいっぱいになりますので、液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。(1.5 mL のチューブを用いることも可能です。)
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いる際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノール

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

ルを完全に取り除きます。乾燥は5分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。

13. 44 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
14. 室温で2分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで2~3分間静置します。この状態で、精製されたDNAは溶液のほうに移っています。
  
16. 上澄み液 約42 uL を新しいPCRプレートもしくは8 strip tube に移します。この液に精製DNAが移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

**Stopping Point** 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管することができます。

### STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質(サイズ)チェック

【2100 Bioanalyzer と DNA1000 チップを使う場合】

バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使います。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350  $\mu$ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、DNA 1000 assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。下記の泳動図のような分布が得られ、125-175 bp の間にピークトップがあることを確認します。もしピークトップが 300bp よりも長いところに見られる場合、ステップ 1 DNA の断片化からステップ 4 Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質(サイズ)チェックまでを再度やり直してください。

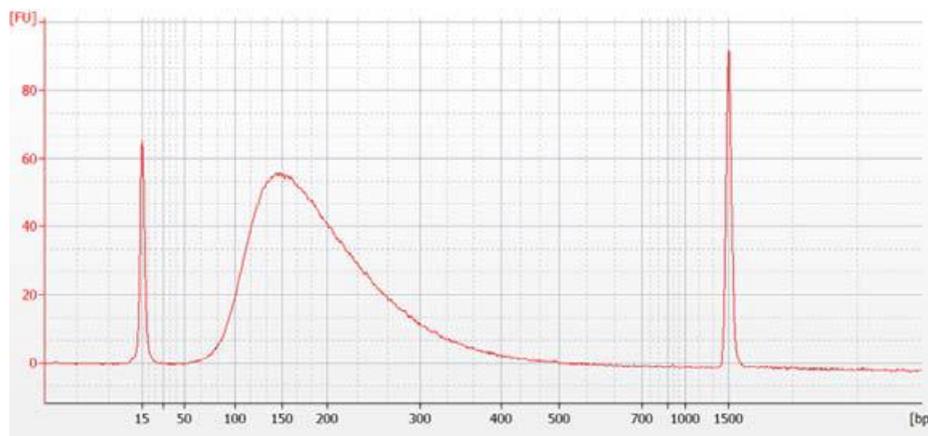


図 2 断片化した gDNA のバイオアナライザ DNA1000 アッセイ による泳動図  
125-175 bp の間の位置にピークトップが見られます。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

### 【2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

#### NOTE

D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。断片化された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

#### CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。図 3 の泳動図のような分布が得られ、125-175 bp 付近にピークトップがみられることを確認します。

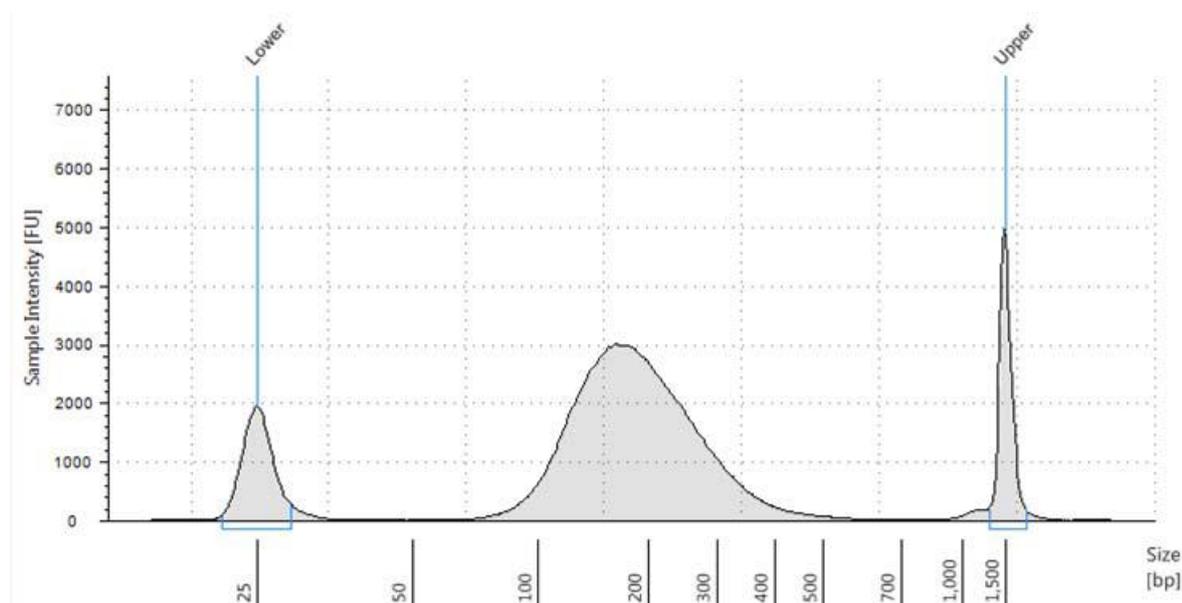


図 3 断片化した gDNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。  
125-175 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

## STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化

SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit, ILM を使用します。

- 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)  
表 6 に従って、サンプル数に応じた反応液を作成します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 6 A オーバーハング付加のマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
10× Klenow Polymerase Buffer (blue cap)	5 µL	82.5 µL
dATP (green cap)	1 µL	16.5 µL
Exo(-) Klenow (red cap)	3 µL	49.5 µL
<b>Total</b>	<b>9 µL</b>	<b>148.5 µL</b>

- DNA サンプル約 41 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製した A オーバーハング付加マスターミックスを 9 uL ずつ加えます。
- ボルテックスミキサーを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。
- サーマルサイクラを用い、37°C で 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heated lid (ふた) は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 7 A オーバーハング付加のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

### STEP6. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

17. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
18. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
19. 前項の STEP5 で調製した A オーバーハング付加後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
20. 室温で、5 分間インキュベーションします。
21. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
22. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
23. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
24. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
25. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
26. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
27. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、1~2 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
28. 35 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドアウンします。
29. 室温で 2 分間インキュベーションします。
30. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
31. 上澄み液 約 33.5 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

32. 次のステップに速やかに進んでください。ここで実験を止めることはできません。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

### STEP7. メチル化用アダプターライゲーション

SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit, ILM を使用します。

- 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)  
表 8 に従って、サンプル数に応じた反応液を作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペッティングにより、溶液を静かに混合します。

表 8 ライゲーションマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Methyl-Seq Methylated Adapter (green cap)	5 µL	82.5µL
5× T4 DNA Ligase Buffer (green cap)	10 µL	165 µL
T4 DNA Ligase (red cap)	1.5 µL	24.75 µL
<b>Total</b>	<b>16.5 µL</b>	<b>272.25 µL</b>

- DNA サンプル 33.5 uL のはいた PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製したライゲーションマスターミックスを 16.5 uL ずつ加えます。
- ボルテックスミキサーを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。
- 20 °C で 15 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid (ふた) は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 9 ライゲーションサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

インキュベーションは 15 分を超えないようにしてください。直ちに次のステップに進み、遊離のアダプターを除いてください。

### STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP7 で調製したアダプターライゲーション後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 22 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 22 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

**Stopping Point** 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

### STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation による DNA サンプルのサイズチェックと定量

【2100 Bioanalyzer と DNA1000 チップを使う場合】

バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使います。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 $\mu$ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。各サンプル 1  $\mu$ L を解析に使用します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。
  - a. 以下の泳動図のように、およそ 200 bp - 300 bp の位置にスミアなシングルピークがあること、アダプター付加前と比べて 30bp 以上のサイズの伸長があることを確認して下さい。
  - b. このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。収量が 350 ng 未満の場合、STEP1(断片化)から STEP8(バイオアナライザの解析)を繰り返して追加のアダプター付加した DNA を調製してください。

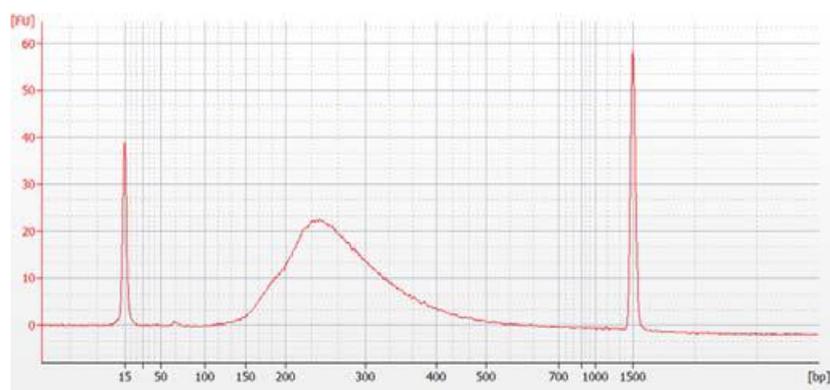


図 4 アダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

200 bp – 300 bp の位置に、シングルスメアピークのピークトップが観察される。

### 【2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

#### NOTE

D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

#### CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。図 5 の泳動図のような分布が得られ、200 - 300 bp 付近にピークトップがみられることを確認します。

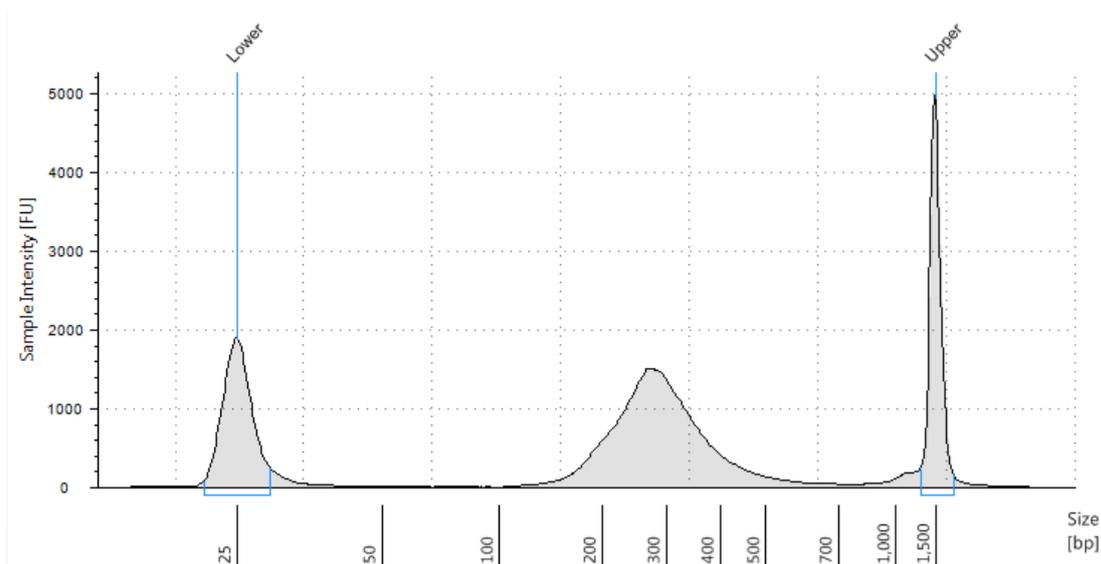


図 5 断片化した gDNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。200 - 300 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

## 2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

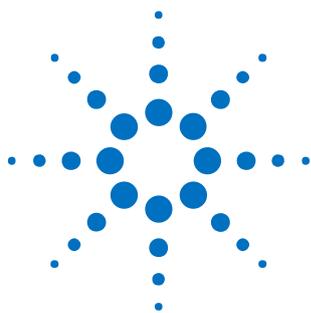
### NOTE

SureSelect Methyl-Seq のハイブリダイゼーションには、少なくとも 350 ng のアダプター付き DNA ライブラリが必要です。通常収量は 350-1,500ng 程度となります。収量が高いほど Duplication の値が低下する傾向があるので、**得られた全量をハイブリダイゼーションに用います**。得られた全量を 3.4 uL の液量にする必要があるため、濃縮遠心機を用いて、サンプルを濃縮してください。濃縮遠心を行う場合、45°C 以上の高い温度をかけないようにしてください。(トミー精工社の濃縮遠心機を使用する場合は、温度は Low,40°C で濃縮遠心します。)

ハイブリダイゼーションに用いる量が 350 ng 以下になると、シーケンスの結果に悪影響を与えます。

実際の操作については、4. ハイブリダイゼーションの章を参考にしてください。

---



## 3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル)

- STEP1. DNA の断片化 35
- STEP2. 末端修復 38
- STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 40
- STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質 (サイズ)チェック 42
- STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化 44
- STEP6. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 45
- STEP7. メチル化用アダプターライゲーション 46
- STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 47
- STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation による DNA サンプルのサイズチェックと定量 48

この章では、イルミナ社のシーケンスプラットフォームを用いて、1 ug の gDNA から、メチル化シトシンを解析するためのターゲットエンリッチメントに使用する gDNA ライブラリを調製する方法を説明します。3 ug の gDNA から実験を行いたい場合は、2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル) からの章をご参照ください。

イルミナ社のオリジナルプロトコルとは、下記に加え、PCR の条件などが異なりますのでご注意ください。

1. コバリスを用いて、150-200 bp をターゲットサイズとした gDNA の断片化を行います。
2. 各ステップでの DNA の精製は、ベックマン・コールター社のビーズを使って行います。断片化サイズは、SureSelect のハイブリダイゼーションの効率に大きな影響を与えるため、gDNA の断片化について、コバリス以外の手法はバリデーションされていません。特にインデックスカスタムキットのプロトコルでは、ゲルによる精製とサイズ選択の代わりに、ビーズを使った核酸精製を行いますので、コバリスで gDNA を確実に断片化することが重要なポイントです。他の手法を使用した場合、保証およびサポートの対象外となります。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

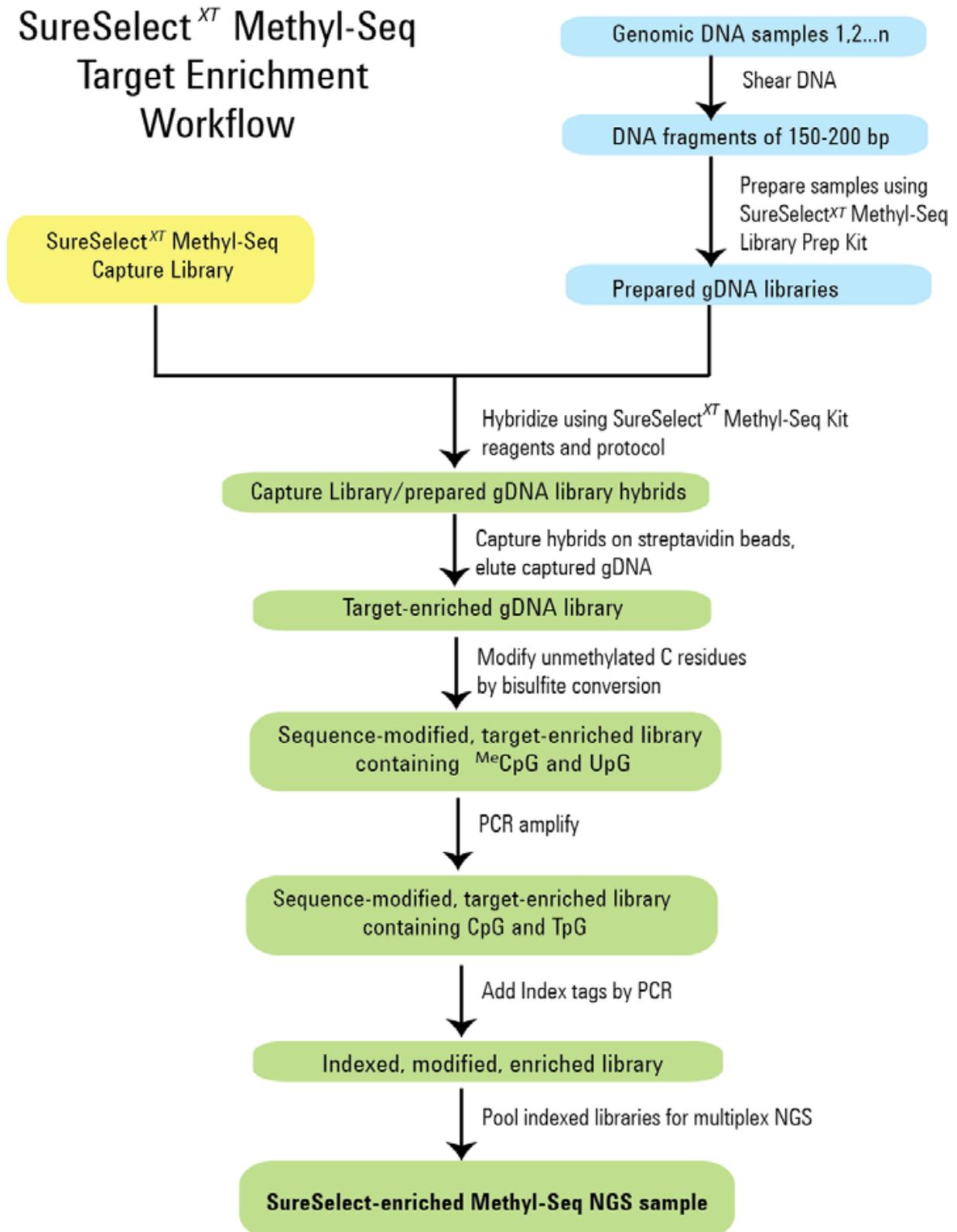


図 6. サンプル調製ワークフロー

## STEP1. DNA の断片化

Agilent SureSelect gDNA Extraction Kit でゲノム DNA を抽出することができます。gDNA Extraction Kit Protocol (p/n 5012-8701) を参照してください。

## NOTE

実験には、OD260/280 の比が 1.8~2.0 の間にある高品質の gDNA を使用ください。できるだけ正確に DNA を定量するために、Qubit システムの使用をお勧めします。

マルチプレックスシーケンスを行う DNA のサンプルごとに、1 つのメチル化アダプター付加ライブラリを調製します。16 サンプルをシーケンスする場合は、16 ライブラリを調製することになります。

1. Qubit dsDNA BR Assay キットを用いて、gDNA の濃度を測定します。  
Qubit のマニュアルにしたがって定量を行ってください。
2. 1.5 mL の LoBind のチューブを用いて、Qubit で定量した gDNA 1 µg を 1x Low TE Buffer で 50 µL になるように溶解します。Methyl-Seq のプロトコルでは、PCR 増幅なしにキャプチャを実施するため、1 ug 以上のスタート量が必要です。量が少ないと、サンプルの複雑性が減少して、シーケンス結果に悪影響を与えるので、ご注意ください。
3. コバリスを起動します。起動してから脱ガスが完了するまで、30 分程度かかります。またこの段階で次に使用する AMPure XP ビーズを室温に戻しておくくと便利です。
  - a. コバリスのウォーターバス内に、Milli-Q 水もしくは脱イオン水を注ぎます。水位は機種と使用しているチューブやプレートのタイプによって異なるため、コバリスの取り扱い説明書に沿ってください。
  - b. コバリスのウォーターバスの水位を、マイクロチューブ (p/n 520045) のキャップより下面のガラスチューブ全体が浸かるように調整してください。
  - c. コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C ~5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
  - d. (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20%[v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。
  - e. ソフトウェアのメインスクリーンから、DEGAS ボタンをクリックして、最低 30 分間 DEGAS を実行してください。  
コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。
4. マイクロチューブを、ローディングステーションの上に載せます。キャップがされた状態であることを確認してください。
5. 先がテーパ状になったピペットチップを用い、コバリスのマイクロチューブのキャップ上面にあるス

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

リットにチップの先を差し込んで、サンプルの全量 (50  $\mu$ L) を入れます。マイクロチューブ内に泡が残らないように注意してください。(泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します。) 必ず Covaris 社指定のマイクロチューブを使用してください。

6. サンプルを入れたマイクロチューブを、コバリスのマイクロチューブホルダーにセットします。表 10 の設定により、gDNA の断片化を行います。ターゲットピークサイズは 150-200 bp です。

表 10 コバリス (SonoLab バージョン 7 以降)

Setting	Value
Duty Factor	10%
Peak Incident Power (PIP)	175
Cycles per Burst	200
Treatment Time	360 seconds
Bath Temperature	4° to 8° C

コバリス (SonoLab バージョン 7 より前)

Setting	Value
Duty Cycle	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
Time	6 cycles of 60 seconds each
Set Mode	Frequency sweeping
Temperature	4° to 7° C

7. 断片化が終了したら、コバリスマイクロチューブをマイクロチューブホルダーから取り出し、ローディングステーションの上に再度載せます。
8. マイクロチューブのふたはそのままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、中のサンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
9. 断片化されたサンプル全量を新しい 96 ウェルプレート、もしくは Strip チューブに移します。96 ウェルプレートもしくは Strip Tube は、280  $\mu$ L 以上の液量が入るものを使用してください。またここで使用するチューブの種類により、この後のビーズ精製で必要なマグネットの種類が変わりますのでご注意ください。
10. **オプション** この時点での DNA サンプルの品質(サイズ)と量を、バイオアナライザの DNA1000 Assay もしくは、TapeStation の D1000 assay で確認することが可能です。手法については、

### 3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル)

STEP4 の章をご参照ください。ここで断片化 DNA を測定した場合は、100-175 bp の間にピーク  
トップがあることを確認します。また、定量を行い、定量値が 20 ng/uL (収量 1,000 ng) に近い値で  
あることを確認してください。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP2. 末端修復

#### CAUTION

キットに含まれている試薬のチューブやボトルは、使用直前に氷上で溶解して下さい。各サンプルに分注する前に、ボルテックスのスピードを高速に設定し、5 秒から 15 秒かけてマスターミックスのチューブやボトルをボルテックス上で混合して下さい。卓上遠心器でスピンドウンして液をチューブやボトルの底に集め、必要な液量を取り分けて各サンプルに分注して下さい。この混合ステップは、使用直前に行ってください。前もって試薬を融解・混合しないで下さい。

粘性が高い試薬があるため、取り分けた試薬が全量サンプルに添加され、ピペットチップの先には液が残っていないことを確認して下さい。サンプルとマスターミックスはボルテックスか 10 回のピペッティングで完全に均一にして下さい。

マスターミックスを完全に混合できていない場合、結果に悪影響を与える可能性があります。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)

表 11 に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 11 エンドリペアミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	35.2 $\mu$ L	580.8 $\mu$ L
10 $\times$ End Repair Buffer (clear cap)	10 $\mu$ L	165 $\mu$ L
dNTP Mix (green cap)	1.6 $\mu$ L	26.4 $\mu$ L
T4 DNA Polymerase (purple cap)	1 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
Klenow DNA Polymerase (yellow cap)	2 $\mu$ L	33 $\mu$ L
T4 Polynucleotide Kinase (orange cap)	2.2 $\mu$ L	36.3 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>52 <math>\mu</math>L</b>	<b>858 <math>\mu</math>L</b>

2. DNA サンプル 48  $\mu$ L が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製した エンドリペアミックスを 52  $\mu$ L ずつ加えます。ボルテックスミキサを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。

### 3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル)

- サーマルサイクラを使い、20°Cで 30 分間インキュベートします。サーマルサイクラの heated lid(ふた)は加熱しないように注意してください。

インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 12 末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 1 サンプルあたり 400ul(+余剰分)(1.5 mL のチューブを用いる場合は 1 ml +余剰分)の 70% エタノールを用時調製します。

#### NOTE

同じ日に実施する別のステップの精製のための 70% エタノールを、ここで一緒に調製してきっちり密封して置いておくことは出来ませんが、エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、調製済み 70% エタノールはその日のうちに使い切ることを推奨します。

サンプル調製のステップでは、1 サンプルあたり 1.2 ml (1.5 mL のチューブを用いる場合は 3 ml) +余剰分の 70% エタノールが必要です。

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 前項の STEP2 で調製した末端修復後の DNA サンプル 100 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、注意して加えます。液がチューブほぼいっぱいになりますので、液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。(1.5 mL のチューブを用いることも可能です。)
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。

### 3. サンプルの調製 (1 ug DNA サンプル)

12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
13. 44 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドアウンします。
14. 室温で 2 分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移動しています。
  
16. 上澄み液 約 42 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移動しているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

**Stopping Point** 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP4. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質(サイズ)チェック

バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使います。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350  $\mu$ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な DNA 1000 assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。下記の泳動図のような分布が得られ、125-175 bp の間にピークトップがあることを確認します。もしピークトップが 300bp よりも長いところに見られる場合、ステップ 1 DNA の断片化からステップ 4 Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による品質(サイズ)チェックまでを再度やり直してください。

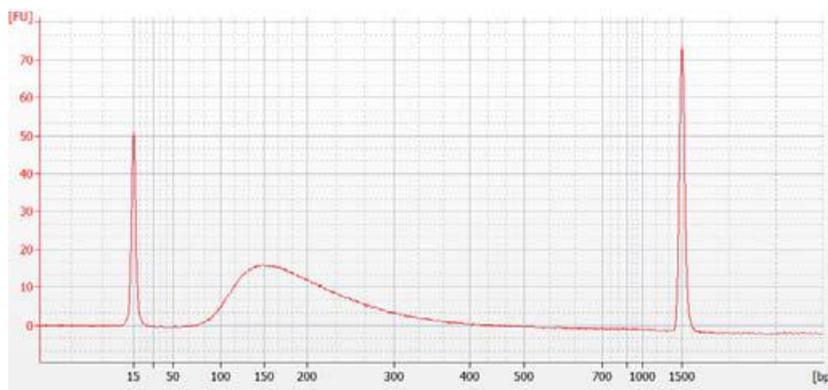


図 7 断片化した gDNA のバイオアナライザ DNA1000 アッセイ による泳動図  
125-175 bp の間の位置にピークトップが見られます。

## 【2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

## NOTE

D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。断片化された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

## CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。下図のような分布が得られ、125-175 bp 付近にピークトップがみられることを確認します。

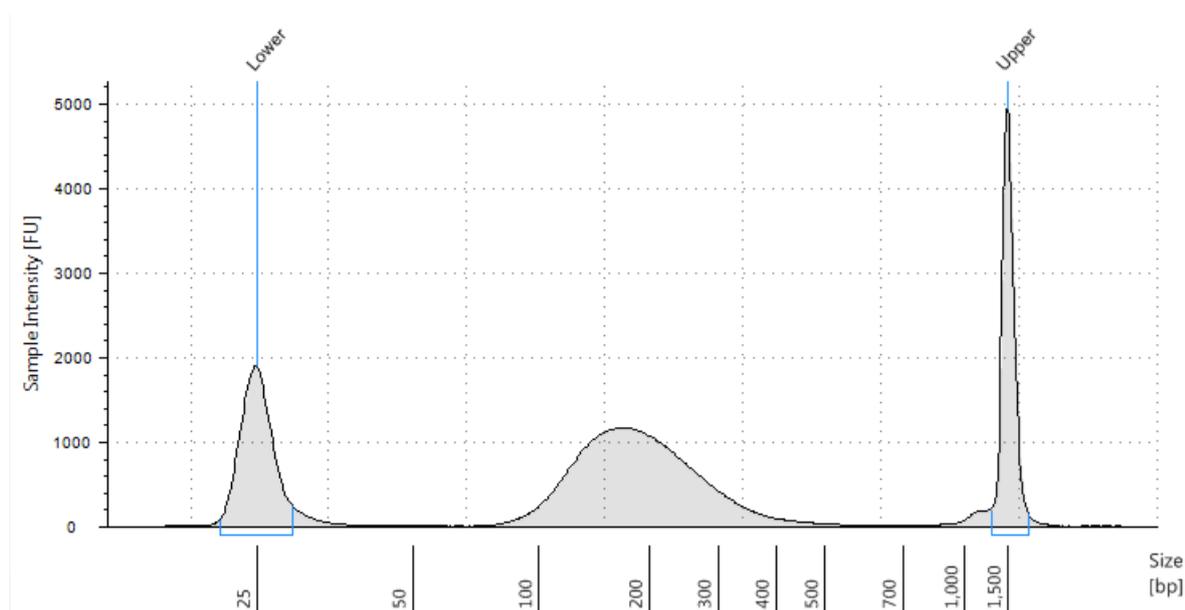


図 8 断片化した gDNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。  
125-175 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP5. DNA 断片の 3'末端のアデニル化

SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit, ILM を使用します。

- 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)  
表 13 に従って、サンプル数に応じた反応液を作成します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 13 A オーバーハング付加のマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
10× Klenow Polymerase Buffer (blue cap)	5 µL	82.5 µL
dATP (green cap)	1 µL	16.5 µL
Exo(-) Klenow (red cap)	3 µL	49.5 µL
<b>Total</b>	<b>9 µL</b>	<b>148.5 µL</b>

- DNA サンプル約 41 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製した A オーバーハング付加マスターミックスを 9 uL ずつ加えます。
- ボルテックスミキサーを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。
- サーマルサイクラを用い、37°C で 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heated lid (ふた) は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 14 A オーバーハング付加のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

#### STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP5 で調製した A オーバーハング付加後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかりません。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7と8のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、1~2 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 35 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドアウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 33.5 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。
16. 次のステップに速やかに進んでください。ここで実験を止めることはできません。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP7. メチル化用アダプターライゲーション

SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit, ILM を使用します。

- 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)  
表 15 に従って、サンプル数に応じた反応液を作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペティングにより、溶液を静かに混合します。

表 15 ライゲーションマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	2.5 µL	41.25 µL
SureSelect Methyl-Seq Methylated Adapter (green cap)	2.5 µL	41.25µL
5× T4 DNA Ligase Buffer (green cap)	10 µL	165 µL
T4 DNA Ligase (red cap)	1.5 µL	24.75 µL
<b>Total</b>	<b>16.5 µL</b>	<b>272.25 µL</b>

- DNA サンプル 33.5 uL のはいた PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、1 で調製したライゲーションマスターミックスを 16.5 uL ずつ加えます。
- ボルテックスミキサを 5 秒間かけてサンプル溶液をよく混合した後、スピンドウンします。
- 20 °C で 15 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid(ふた)は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 16 ライゲーションサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

インキュベーションは 15 分を超えないようにしてください。直ちに次のステップに進み、遊離のアダプターを除いてください。

#### STEP8. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP7 で調製したアダプターライゲーション後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 22 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 22 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

#### Stopping Point

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

#### STEP9. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation による DNA サンプルのサイズチェックと定量

バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使います。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 $\mu$ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。各サンプル 1  $\mu$ L を解析に使用します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、DNA1000 assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。
  - a. 以下の泳動図のように、およそ 200 bp - 300 bp の位置にスミアなシングルピークがあること、アダプタ付加前と比べて 30bp 以上のサイズの伸長があることを確認して下さい。
  - b. このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。収量が 350 ng 未満の場合、STEP1(断片化)から STEP8(バイオアナライザの解析)を繰り返して追加のアダプター付加した DNA を調製してください。

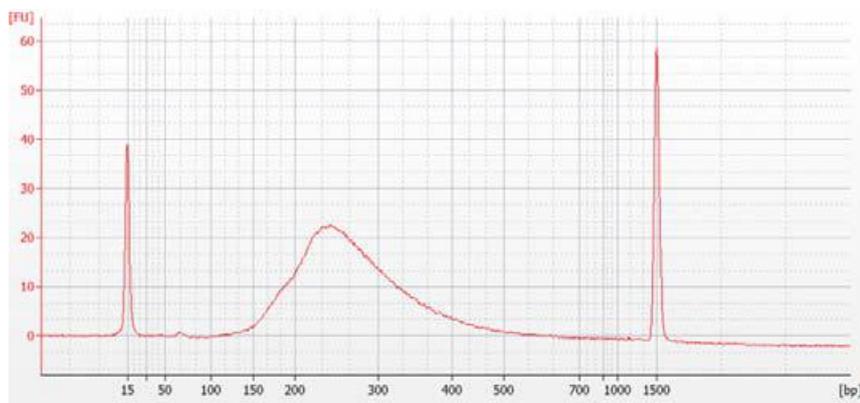


図 9 アダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図  
200 bp – 300 bp の位置に、シングルスミアピークのピークトップが観察される。

#### 【2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

##### NOTE

D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。断片化された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

##### CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。下図のような分布が得られ、200 - 300 bp 付近にピークトップがみられることを確認します。

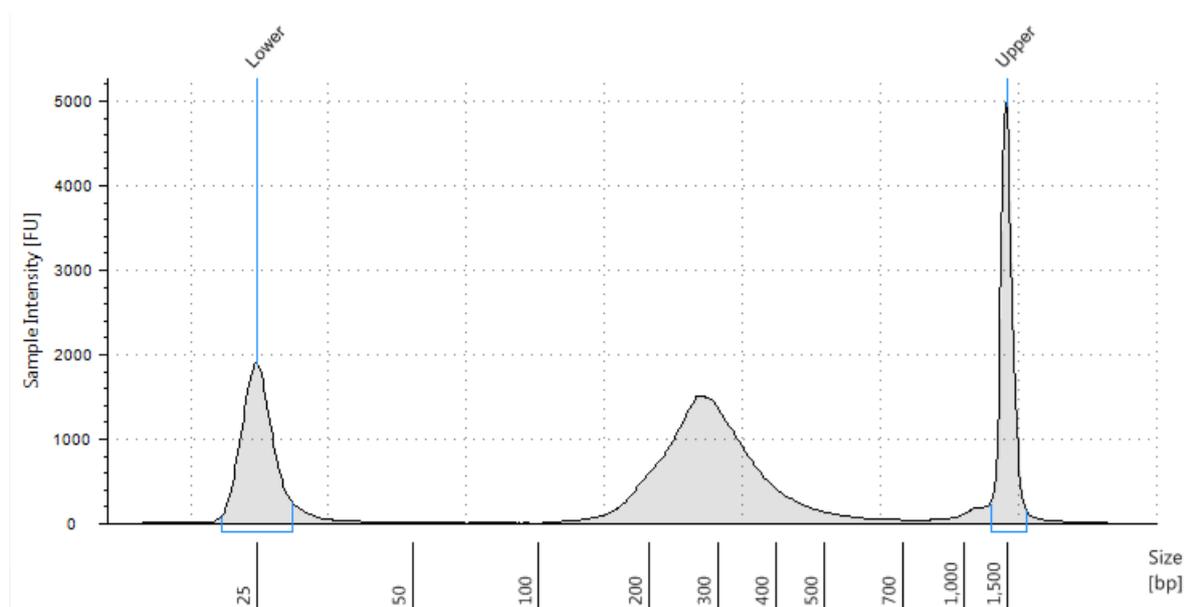


図 10 断片化した gDNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。  
200 - 300 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

### 3. サンプルの調製(1 ug DNA サンプル)

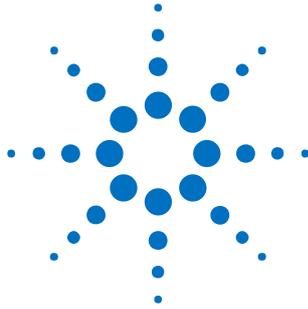
#### NOTE

SureSelect Methyl-Seq のハイブリダイゼーションには、少なくとも 350 ng のアダプター付き DNA ライブラリが必要です。通常収量は 350-1,500ng 程度となります。収量が高いほど Duplication の値が低下する傾向があるので、**得られた全量をハイブリダイゼーションに用います**。得られた全量を 3.4 uL の液量にする必要があるため、濃縮遠心機を用いて、サンプルを濃縮してください。濃縮遠心を行う場合、45°C 以上の高い温度をかけないようにしてください。(トミー精工社の濃縮遠心機を使用する場合は、温度は Low,40°C で濃縮遠心します。)

ハイブリダイゼーションに用いる量が 350 ng 以下になると、シーケンスの結果に悪影響を与えます。

実際の操作については、次の章を参考にしてください。

---



## 4. ハイブリダイゼーション

STEP1. ハイブリダイゼーション 52

STEP2. 磁気ビーズの調製 57

STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 58

この章では、調製したライブラリとハイブリダイゼーション試薬、ブロッキング試薬、および SureSelect Methyl-Seq キャプチャライブラリをハイブリダイズさせる手順について説明します。

### CAUTION

SureSelect キャプチャライブラリとアダプター付き DNA ライブラリの比は、高い Capture 効率を得るために極めて重要です。プロトコル記載の量に従って、ハイブリダイゼーションを行ってください。

ハイブリダイゼーションからバイサルファイト変換までは実験を止めることができませんので、実験計画にご注意下さい。

## 4. ハイブリダイゼーション

### STEP1. ハイブリダイゼーション

#### CAUTION

capture のためのハイブリダイゼーションは 16 時間行いますが、この間に 27-29  $\mu\text{L}$  という少量のハイブリ溶液の蒸発を防ぐ必要があります。

実験を行う前に、必ず、実験で使用する予定のサーマルサイクラ装置 (Heated lid 付き)、Strip チューブもしくはプレート、シール方法 (Strip キャップもしくはシーリングテープ) の組み合わせで、オリゴキャプチャライブラリとアダプター付き DNA ライブラリを入れない状態で 27 $\mu\text{L}$  の水を用い、65°C で 16 時間 (以上)、事前テストを行ってください。必ず使用する予定のウェルポジションに、テストサンプルをセットして試験するようにしてください。(ウェルによっては、端と中央で、蒸発が異なるものがあります。)

キャップもしくはシールによる密閉を確実に行うことが重要です。

蒸発量は 3-4  $\mu\text{L}$  を超えないようにしてください。(ハイブリダイゼーション後に、最低でも 20  $\mu\text{L}$  の液が残ること。)

手持ちの組み合わせでのテストで、3-4  $\mu\text{L}$  以上の蒸発が見られる場合、巻末の組み合わせリストを参照して、適切な組み合わせを探してください。

Methyl-Seq の場合、メチル化アダプターをライゲーションし、かつ PCR をかけずにキャプチャを行い、バイサルファイト変換処理を実施するため、シーケンスでの Duplication の割合が相対的に高くなります。Duplication Read の割合をできるだけ抑えるための対策として、SureSelect Methyl-Seq のハイブリダイゼーションでは、メチル化アダプター付きライブラリの全量をハイブリダイゼーション反応に使用してキャプチャ効率を上げています。

#### CAUTION

SureSelect Methyl-Seq では、前項までの操作で得られたメチル化アダプター付きライブラリの全量をハイブリダイゼーションに使用します。全エクソンキットと異なるポイントですので、ご注意ください。

## 4. ハイブリダイゼーション

1. 調製したメチル化アダプター付き DNA ライブラリの液量が 3.4  $\mu\text{L}$  以下になるように濃縮遠心機を用いて濃縮してください。45°C 以下の低温で濃縮遠心機を用いて下さい。  
チューブ内のサンプルは完全に乾固させないでください。  
1.5 ml チューブをご使用になる場合は、メチル化アダプター付き DNA ライブラリの全量を 1.5 mL のチューブに入れ、チューブのふたに1つ以上の穴をあける、またはチューブのふたを取り去り、パラフィルムでかわりにふたをして、そのパラフィルムに穴をあけて濃縮遠心を行ってください。
2. 3.4 $\mu\text{L}$  の nuclease-free 水に再溶解させます。ピペッティングによってチューブの内壁に付着したサンプルをよく再溶解させてください。
3. ボルテックスミキサを用いて混合し、遠心機で1分間スピンドウンします。
4. 表 17 に従って、1.5 mL のチューブにハイブリダイゼーションバッファを室温で調製します。

表 17 ハイブリダイゼーションバッファミックス

Reagent	Volume for 1 reaction*	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Hyb 1 (orange cap or bottle)	6.63 $\mu\text{L}$	116 $\mu\text{L}$
SureSelect Hyb 2 (red cap)	0.27 $\mu\text{L}$	4.7 $\mu\text{L}$
SureSelect Hyb 3 (yellow cap or bottle)	2.65 $\mu\text{L}$	46.4 $\mu\text{L}$
SureSelect Hyb 4 (black cap or bottle)	3.45 $\mu\text{L}$	60.4 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>	<b>13 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>227.5</b>

※ピペッティングの誤差を防ぐために、最低 5 反応分は調製するようにしてください。

※Hyb #3 (黄キャップ) は -20°C保存品です。使用後の保存にご注意ください。

ハイブリダイゼーションバッファミックスを 65°C で 5 分間温めてください。その後、20°C 未満に冷えないように注意して保管します。ハイブリダイゼーションミックスは 20°C 未満の温度では析出し、結果に著しい悪影響を与える危険性があります。65°C で 5 分間加熱した後は、25°C に設定したヒートブロック中にハイブリダイゼーションミックスを置くことを推奨します。65°C で 5 分以上置くと、バッファは蒸発してしまうので、65°C での加熱は 5 分間としてください。

#### 4. ハイブリダイゼーション

- 別のチューブを準備して、表 18 を参照して SureSelect Block Mix を必要量調製します。混合した後、ピペティングでよく混合します。

表 18 SureSelect Block Mix

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Indexing Block 1 (green cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect Block 2 (blue cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect ILM Indexing Block 3 (brown cap)	0.6 µL	10.2 µL
<b>Total</b>	<b>5.6 µL</b>	<b>95.2 µL</b>

#### CAUTION

以下の各ステップでは、PCR プレートもしくは 8 strip tube の Cap Strip をステップごとに外す必要があります。再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用することを推奨します。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。ご注意ください。

- 前項で調製し、8 strip tube に入れたアダプター付き DNA ライブラリに、表 16 に従って調製した SureSelect Block Mix を 5.6 µL ずつ加えます。ピペティングにより、よく混合します。
- アダプター付き DNA ライブラリと SureSelect Block Mix の混合液が入った 8 Strip tube にしっかりとキャップをして、サーマルサイクラにセットし、以下のプログラムで加熱します。heat lid(ふた)の温度を 105 °C にセットするようにしてください。95 °C の加熱の後の 65 °C のインキュベーションは、次のステップでキャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックスを加えるまで、少なくとも 2 分間は行うようにします。

表 19 PCR プログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	95°C	5 minutes
Step 2	65°C	2 minutes
Step 3	65°C	Hold

#### CAUTION

heat lid(ふた)は熱くなるので、触れてやけどをしないように十分ご注意ください。

8. 表 20 を参照して、必要量の RNase Block 希釈液を調整します。1.5 mL のチューブで RNase Block 溶液 (紫キャップ) を RNase-free 水で希釈して、必要量の RNase Block 希釈液を調製し、氷上に置きます。

表 20 RNase Block 希釈液の調製

Component	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
RNase Block (purple cap)	0.5 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L
Nuclease-free water	1.5 $\mu$ L	25.5 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>2 <math>\mu</math>L</b>	<b>34 <math>\mu</math>L</b>

## NOTE

次のステップでのハイブリダイゼーションバッファとキャプチャライブラリと RNase Block 希釈液の混合液の作製は、前項の加熱プログラムが 65 °C、2 分間のほぼ終わりに近づいた時に行うようにしてください。この混合液は、次のステップでアダプター付き DNA ライブラリと SureSelect Block Mix の混合液に加えるまで、短時間室温に置きます。SureSelect キャプチャライブラリを室温に置く時間は、できるだけ短くなるようにしてください。

9. 適切なチューブに、ハイブリダイゼーションバッファミックス、RNaseBlock 希釈液、SureSelect Methyl-Seq オリゴキャプチャライブラリを入れます。高速のボルテックスで 5 秒間攪拌し、軽くスピンドウンします。次のステップで使用するまで、この混合液は室温に置いてください。すぐにステップ 10 にすすみます。

表 21 キャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックスの作製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Hybridization Buffer mixture from step 4	13 $\mu$ L	221 $\mu$ L
25% RNase Block solution from step 8	2 $\mu$ L	34 $\mu$ L
SureSelect Human Methyl-Seq Capture Library	5 $\mu$ L	85 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	<b>340 <math>\mu</math>L</b>

#### 4. ハイブリダイゼーション

- Step9 で調製したキャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックス 20 uL を、サーマルサイクラ中のアダプタ付き DNA ライブラリと Block Mix の混合液の入った 8 strip tube の各チューブに入れます。ピペティングを 8-10 回程度行い、よく混合します。必要に応じてマルチピペットを使用してください。作業中はサーマルサイクラ中の 8 strip tube を 65 °C に保つようにして下さい。ハイブリダイゼーション反応液(アダプター付き DNA ライブラリ、ブロッキング試薬、ハイブリダイゼーションバッファ、SureSelect オリゴキャプチャライブラリをすべてミックスした状態)はこの時点で 27-29 uL の量となります。量はこれまでの操作中の蒸発により異なります。
- 8 strip tube を Cap Strip で密閉します。必ず新しいキャップを使用してください。適切なキャッピングツールなどを用いて、密閉が確実に行われるようにして下さい。事前のテストで蒸発が抑えられることを確認しているキャップを用いて、8 strip tube を確実に密閉します。

#### CAUTION

サンプルが入ったすべてのチューブが確実に密閉されていることを確認してください。チューブとキャップの間にわずかでも隙間があると、液はハイブリダイゼーション中に蒸発してしまいます。ハイブリダイゼーション中に 3 – 4 uL 以上の溶液が蒸発しないように、事前に使用するチューブ、キャップの組み合わせでテストしてください。

- Heat lid(ふた)を 105 °C に加熱した状態で、65 °C で 16 時間、ハイブリダイゼーションします。溶液の蒸発を防ぐために、ふたは必ず 105 °C に加熱してください。

## STEP2. 磁気ビーズの調製

1. ボルテックスミキサーを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies、ベリタス) 磁気ビーズを十分に再懸濁します。磁気ビーズは必ず指定のものを使用してください。
2. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube を用意し、50 uL の Dynal 磁気ビーズを 1 サンプルあたり 1 ウェルに加えます。
3. ビーズを次の手順で洗浄します。
  - a. 200 uL の **SureSelect Binding Buffer** を加えます。
  - b. ビーズをピペッティングによりよく混合します。
  - c. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで静置します。
  - d. ビーズを吸い込まないように注意しながら、上澄み液を取り除いて廃棄します。
  - e. ステップ a から d までを計3回繰り返して、ビーズを洗浄します。
4. ビーズを 200 uL の **SureSelect Binding Buffer** に再懸濁します。

## 4. ハイブリダイゼーション

### STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収

#### CAUTION

SureSelect Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。もし SureSelect Elution Buffer を長時間空気にさらしてしまつた場合は、使用前に pH 試験紙で pH が 12.5~13.5 の間であることを確認してください。pH が 12 以下になると、収量が下がるおそれがあるので、使用しないでください。

**SureSelect Elution Buffer のボトルは、使用しないときには確実にキャップを閉めるようにしてください。**

1. 16 時間のハイブリダイゼーション後、残っているハイブリダイゼーション溶液 (メチル化アダプター付き DNA と SureSelect Methyl-Seq オリゴキャプチャライブラリの混合液) の量を、ピペットを使って測定し、記録します。複数のサンプルを同時にキャプチャしている場合は、ひとつずつ作業を行い、他のサンプルは 65°C の PCR 装置に載せたままで、ビーズ溶液と混ぜるまでキャップを開けて蒸発させたり、冷やしたりしないように注意してください。この計測はできるだけ短時間に行ってください。20µL 以下に液が減っている場合、キャプチャ性能に悪影響を与える可能性があります。また蒸発してしまっている場合は、実験をこれ以上進めることができません。再度、蒸発を最小に防ぐための組み合わせを確認ください。目視で液量が十分にあるときには、液量を計測せずに、マルチピペットを用いて、液を一度にビーズ溶液のチューブに加えてもかまいません。
2. PCR プレートまたはチューブを PCR 装置で 65°C に保ちながら、マルチチャンネルピペットで吸引して計量したハイブリダイゼーション溶液全量を、そのまま直接ビーズ溶液に加えます。3~5 回ゆっくりピペッティングをして、液を混合します。続けて次のサンプルを処理する場合は、必ずピペットチップを新しいものに交換し、目盛を 29 µL に戻すようにしてください。
3. PCR プレートもしくは 8 strip tube にキャップをして、ハイブリダイゼーション溶液とビーズの入ったチューブを巡回運動するミキサーの上にセットし、室温で 30 分間インキュベーションします。ビーズがチューブ中を動いて攪拌が行われていることを確認してください。
4. 30 分間のインキュベーションの間に、下記のように Wash Buffer 2 を 65°C で加温しておきます。
  - a. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に Wash Buffer 2 を 200 ul ずつ分注します。  
1 サンプルあたり 3 ウェル準備します。
  - b. PCR プレートもしくは 8 strip tube にキャップをして、サーマルサイクラー中で 65°C でインキュベーションします。heated lid は ON にしてください。
5. 3. のインキュベーション後、PCR プレートもしくは 8 strip tube を軽くスピンドウンします。
6. PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。(ビーズを吸い込むと、収量に影響します。)

7. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、200  $\mu$ L の **SureSelect Wash 1** を加え、ピペッティングでよく混合して、ビーズを再懸濁させます。
8. PCR プレートもしくは 8 strip tube にキャップをして、サンプルを室温で 15 分間インキュベーションします。
9. 軽くスピンドウンします。
10. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除きます。

### CAUTION

以降の Wash ステップで、反応液の温度を 65°C に保つことは、キャプチャの特異性を確保するために重要です。使用する前に、SureSelect Wash Buffer 2 が 65°C に余熱されていることを確認してください。

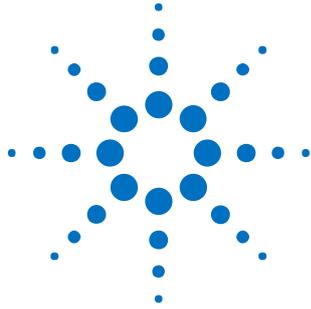
65°C でのインキュベーションのステップに、組織培養用インキュベータのような温度振れ幅の大きい装置は使用しないでください。

11. ビーズを次の手順で洗浄します。
  - a. 事前に 65 °C に加温しておいた **SureSelect Wash 2** を 200  $\mu$ L をビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に加え、ピペッティングでよく混合してビーズを再懸濁させます。
  - b. キャップをしてサンプルの入った PCR プレートもしくは 8 strip cap を 65°C にセットしたサーマルサイクラで 10 分間インキュベーションします。組織培養用インキュベータは温度を適切に保てないため使用しないで下さい。
  - c. 軽くスピンドウンします。
  - d. PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。
  - e. ステップ a から d までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。
  - f. 3 回の洗浄の後、ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットして、Wash 2 を完全に取り除きます。
11. ビーズの入ったチューブに、20  $\mu$ L の SureSelect Elution Buffer を加えます。アルカリ性なので、取り扱いには特に注意してください。Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。ボルテックスミキサで 5 秒間攪拌して、ビーズを再懸濁させます。
12. 室温で 20 分間インキュベーションします。20 分を超えないようにしてください。この 20 分の待ち時間の間に、次のバイサルファイト変換反応の Step1 と Step2 に記載の Zymo Research の EZ DNA Methylation-Gold Kit の CT Conversion Reagent の準備をしておきます。
13. ビーズの入ったチューブを専用の磁石にセットして 2 ~3 分間置き、ビーズと Elution Buffer を分離し

#### 4. ハイブリダイゼーション

ます。

14. ピペットを用いて、上澄み液を新しい PCR プレートまたは 8 strip tube に移します。この時点で **SureSelect** のオリゴにキャプチャされた DNA ライブラリは上澄み液の方に移っていますので、上澄み液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。すぐに次ページのバイサルファイト変換反応に進みます。この時点での保管は出来ません。



## 5. バイサルファイト変換反応

STEP1. キャプチャされた DNA のバイサルファイト変換処理 62

STEP2. バイサルファイト処理ライブラリの PCR 増幅 64

STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 66

この章では、メチル化された DNA segment とメチル化されていない DNA segment を区別するために、キャプチャされた DNA ライブラリをバイサルファイト（重亜硫酸塩）で処理するステップについて説明します。バイサルファイトで処理すると、ライブラリに含まれるメチル化されていないシトシン残基はウラシル残基に変換されます。メチル化シトシンは変換されないため、NGS 解析で塩基配列の違いとして検出・定量されます。

脱スルホン化の後、処理した DNA は PCR で増幅し、サンプル中のウラシル残基をチミン残基に変換します。PCR のサイクル数は PCR 由来のバイアスが最小となるよう制限されています。

## 5. バイサルファイト変換反応

### STEP1. キャプチャされた DNA のバイサルファイト変換処理

このステップでは、Zymo Research の EZ DNA Methylation-Gold Kit の試薬を使用し、キャプチャされた DNA ライブラリに含まれるメチル化されていないシトシン残基をバイサルファイト変換反応によりウラシル残基に変えます。処理した DNA は次に Zymo-Spin IC カラムと EZ DNA Methylation-Gold Kit の他の試薬を使用して脱スルホン化します。

1. CT Conversion Reagent のバイアルを 1 本取り出し、900  $\mu$ L の Nuclease-free 水、300  $\mu$ L の M-Dilution Buffer、および 50  $\mu$ L の M-Dissolving Buffer を加えて再懸濁します。(1 サンプルあたり、130  $\mu$ L を使用します。10 サンプル以上処理する場合は 2 本以上を使用します)
2. ボルテックスミキサで時々攪拌しながら、室温で 10 分間混ぜます。2 分ごとにボルテックスを 20 秒間かける作業を 5 回繰り返します。
3. 20  $\mu$ L のキャプチャされたライブラリサンプルに対し、130  $\mu$ L の CT Conversion Reagent (step2) を加えます。短くボルテックスして攪拌し、スピンドウンします。
4. 反応液を 75  $\mu$ L ずつ 2 本の PCR チューブに分注します。
5. チューブをサーマルサイクラにセットし、表 20 のプログラムを実行し、64°C で 2.5 時間、バイサルファイト変換を行います。

#### NOTE

Zymo Research キットのバイサルファイト変換プロトコルでは最初に 98°C でのインキュベーションが含まれます。このステップは表 22 の通り、SureSelect Methyl-Seq プロトコルでは省略されています。  
反応時間を正確にコントロールするために表 22 の通り 4°C で Hold のステップを加えていますが、64°C でのバイサルファイト変換ステップが完了したらすぐに次の脱スルホン化に進んでください。4°C で長時間サンプルを放置しないで下さい。

表 22 バイサルファイト変換反応のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	64°C	2.5 hours
Step 2	4°C	Hold

6. Zymo-Spin IC カラムを用いてサンプルを脱スルホン化します。各 DNA ライブラリのチューブ 2 本の 75  $\mu$ L を合わせて 150  $\mu$ L にし、その DNA サンプルに対し 1 本のカラムを使用します。脱スルホン化のステップを始める前に EZ DNA Methylation-Gold Kit の M-Wash buffer に 80% のエタノールが入っていることを確認してください。詳細はキットの説明書を参照ください。

- a. 600  $\mu$ L の M-Binding Buffer を Zymo-Spin IC カラムに加え、カラムをコレクションチューブにセットします。
- b. 150  $\mu$ L の バイサルファイト処理 DNA サンプルをカラムに加えます。
- c. カラムにキャップをし、カラムを 5 回転倒混和します。13,000 rpm で 60 秒遠心します。廃液を捨て、カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- d. カラムに 100  $\mu$ L の 調製された M-Wash Buffer を加えます。13,000 rpm で 60 秒遠心します。廃液を捨て、カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- e. 200  $\mu$ L の M-Desulphonation Buffer をカラムに加えます。室温で 20 分間インキュベートします。
- f. 13,000 rpm で 60 秒遠心します。廃液を捨て、カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- g. カラムに 200  $\mu$ L の 調製された M-Wash Buffer を加えます。13,000 rpm で 60 秒遠心します。廃液を捨て、カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- h. 再度カラムに 200  $\mu$ L の 調製された M-Wash Buffer を加えます。13,000 rpm で 60 秒遠心します。
- i. カラムを新しい 1.5 mL のチューブに移します。
- j. カラムを室温で 2 分間静置します。
- k. 10  $\mu$ L の M-Elution Buffer をカラムに加え、室温で 3 分間インキュベートします。
- l. 13,000 rpm で 60 秒遠心します。
- m. 溶出液を残したまま 10  $\mu$ L の M-Elution Buffer をカラムに加え、室温で 3 分間インキュベートします。
- n. 13,000 rpm で 60 秒遠心します。20  $\mu$ L の 溶出液を以降の実験で使用します。

**Stopping Point** 次のステップをすぐに行わない場合、精製した DNA サンプルは-20°C で保存できます。

## 5. バイサルファイト変換反応

### STEP2. バイサルファイト処理ライブラリの PCR 増幅

このステップでは、SureSelect Methyl-Seq で濃縮し、バイサルファイト処理したライブラリを PCR で増幅します。必要な量の DNA ライブラリを最少の PCR サイクル数で調製するようにデザインされたサイクリング条件を使用します。

バイサルファイト処理ライブラリ 1 つにつき、キャプチャ後 PCR 反応液 1 反応分を調製してください。

1. 表 23 を参照して適切な量の PCR 反応液を調製してください。ボルテックスミキサーでよく混ぜ、氷上に置きます。

表 23 キャプチャ後 PCR 反応液の調製

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 16 Reactions (includes excess)
Nuclease-free water	30 $\mu$ L	495 $\mu$ L
SureSelect Methyl-Seq PCR Master Mix	50 $\mu$ L	825 $\mu$ L
Methyl-Seq PCR1 Primer F	1 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
Methyl-Seq PCR1 Primer R	1 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
<b>Total Volume</b>	<b>82 <math>\mu</math>L</b>	<b>1353 <math>\mu</math>L</b>

2. 増幅反応を行う数だけ、82  $\mu$ L の PCR 反応液 (step 1) を PCR プレートのウェルに入れます。
3. 18  $\mu$ L の各バイサルファイト処理ライブラリを PCR 反応液が入ったウェルそれぞれに加えます。ピペッティングでよく混ぜ合わせます。

#### NOTE

お使いになるサーマルサイクラが 100  $\mu$ L の液量に対応していることを確認してください。100  $\mu$ L の液量をサポートしていない機種の場合、その機種がサポートしている液量にあわせて、適切に分注するようにしてください。

4. プレートをサーマルサイクラにセットし、表 24 の PCR 増幅プログラムを実行します。

表 24 バイサルファイト処理ライブラリの PCR 増幅プログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	2 minutes
2	8	95°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	30 seconds
3	1	72°C	7 minutes
4	1	4°C	Hold

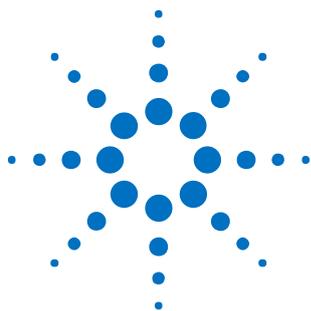
### STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 1 サンプルあたり 400ul(+余剰分)(1.5 mL のチューブを用いる場合は 1 ml +余剰分)の 70% エタノールを用時調製します。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 前項の STEP2 で調製した PCR 後の DNA サンプル 100 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いる際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
13. 21 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
14. 室温で 2 分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。

## 5. バイサルファイト変換反応

16. 上澄み液 約 19.5 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール



### 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加  
69

STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 71

STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation によるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認 73

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール 76

STEP5. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation によるインデックス付き DNA プールの定量とサイズ確認 77

この章では、バイサルファイト変換処理を行い、PCR 増幅したライブラリにインデックスタグを付けるステップと、インデックス付きサンプルをマルチプレックスシーケンシングのためにプールするステップについて説明します。

## STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加

### CAUTION

ライブラリのカロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

キャプチャされたライブラリプール 1 つにつき 1 回分の PCR 反応液を調製してください。

1. サンプルに適切なインデックスを割り当てます。SureSelect PCR Primer Indexes A01 から H02 または H12 までのインデックス部分の塩基配列情報については、巻末のリファレンスを参照してください。

Illumina 社の HiSeq システムと TruSeq PE Cluster Kit (v. 3.0) をお使いの場合、1 レーンの最適なインデックスの数は 2 です。他のシステムをお使いの場合には、適切な Illumina 社のプロトコルを参照して最適なインデックスの数を決めてください。

インデックスの選択は最適なクラスタ識別となるよう注意して行ってください。イルミナ社の Multiplexed Sequencing マニュアルを必ず参照してください。

2. 表 25 に従い、サンプル数に応じた PCR 反応液を調製します。ボルテックスでよく混合し、氷上に置きます。

表 25 PCR Indexing Reaction Mix の調製

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 16 Reactions (includes excess)
SureSelect Methyl-Seq PCR Master Mix	25 µL	412.5 µL
SureSelect Methyl-Seq Indexing Primer Common	0.5 µL	8.25 µL
<b>Total Volume</b>	<b>25.5 µL</b>	<b>420.75 µL</b>

3. 反応液 25.5 µL を PCR プレートの増幅反応を行うウェルに入れます。
4. 19.5 µL のバイサルファイト処理、PCR 増幅、精製したライブラリを各ウェルに加え、ピペッティングでよく混ぜます。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。
5. PCR Primer Index A01 から H02 または H12 のうち、適切なプライマー 5 µL を、それに対応する PCR 反応液が入ったウェルに加え、ピペッティングでよく混ぜます。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

6. プレートをサーマルサイクラにセットし、表 26 の PCR プログラムを実行します。この時点で PCR 終了後の精製に用いる AMPure XP ビーズを、室温に戻しておくと便利です。

表 26 PCR Indexing cycling program

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	2 minutes
2	6	95°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	30 seconds
3	1	72°C	7 minutes
4	1	4°C	Hold

## STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 1 サンプルあたり 400ul(+余剰分)(1.5 mL のチューブを用いる場合は 1 ml +余剰分)の 70% エタノールを用時調製します。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 前項の STEP1 で調製した Index PCR 後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、1~2 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
13. 24 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
14. 室温で 2 分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

16. 上澄み液 約 24  $\mu\text{L}$  を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

**Stopping Point:** 次のステップをすぐに行わない場合、サンプルは 4°C で一週間保存できます。それ以上置く場合は、-20°C で保存してください。

### STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザもしくは TapeStation によるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

バイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを用い、インデックスタグ付加後(前頁)のライブラリサンプルの収量とサイズ分布を測定します。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350  $\mu$ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(**version B.02.07** もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。

#### NOTE

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースライン不安定を引き起こすことがあります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1  $\mu$ L に 1x TE を数  $\mu$ L 加えて希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1  $\mu$ L とって測定することをお勧めします。希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、High Sensitivity DNA assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 250 bp から 300 bp の間にシングルピークのピークトップがあることを確認します。エレクトロフェログラムの例を図 7 に示します。  
インデックス付きライブラリサンプルのいずれかでプライマーダイマーが検出されたら、サンプルをプールした後、精製のやり直しが必要です。
8. バイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いてピークの濃度を測定します。  
このステップで測定したインデックス付きライブラリの量をシーケンシングのためのサンプルプール

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

の際に使用します。

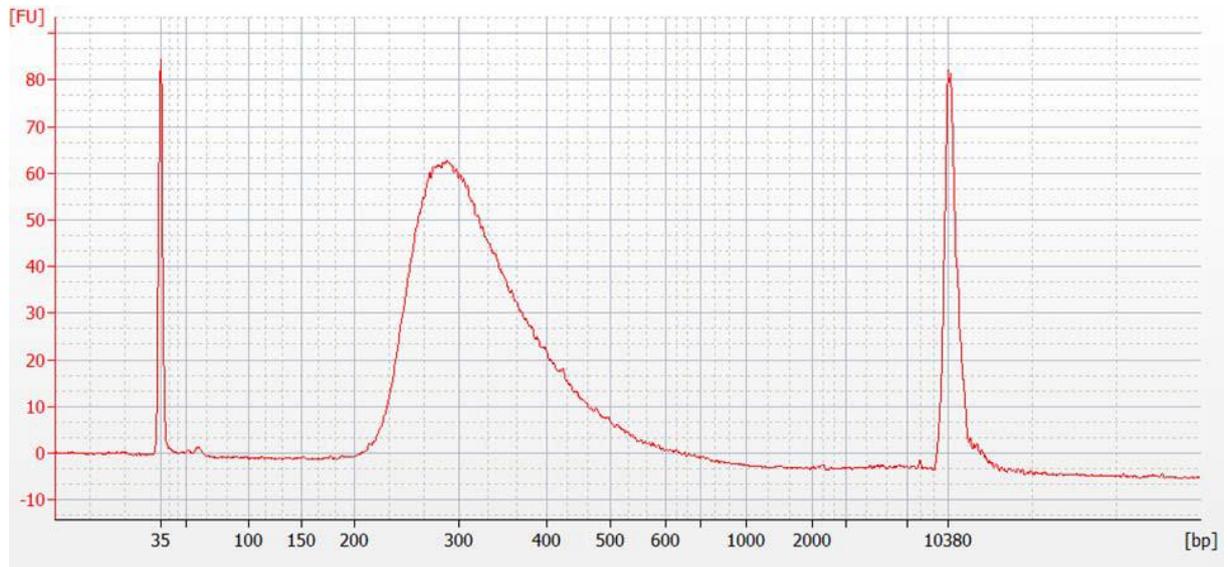


図 11 High Sensitivity DNA キットを用いたインデックス付き DNA サンプルの定量とサイズ確認  
250 bp-300 bp の間のサイズに、シングルピークのピークトップが観察される。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

【2200 TapeStation と High Sensitivity D1000 Screen Tape を使う場合】

### NOTE

High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5584) と High Sensitivity D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5585) を使用する方法を選択することができます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。インデックス付加された DNA サンプルを 2 uL 取り、High-Sensitivity D1000 sample buffer 2 uL と混合します。

### CAUTION

正確な定量のために、DNA と High Sensitivity D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、High-Sensitivity D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。以下図の泳動図のような分布が得られ、250 - 300 bp 付近に DNA ライブラリのピークトップがあることを確認します。インデックス付きライブラリサンプルのいずれかでプライマーダイマーが検出されたら、サンプルをプールした後、精製のやり直しが必要です。

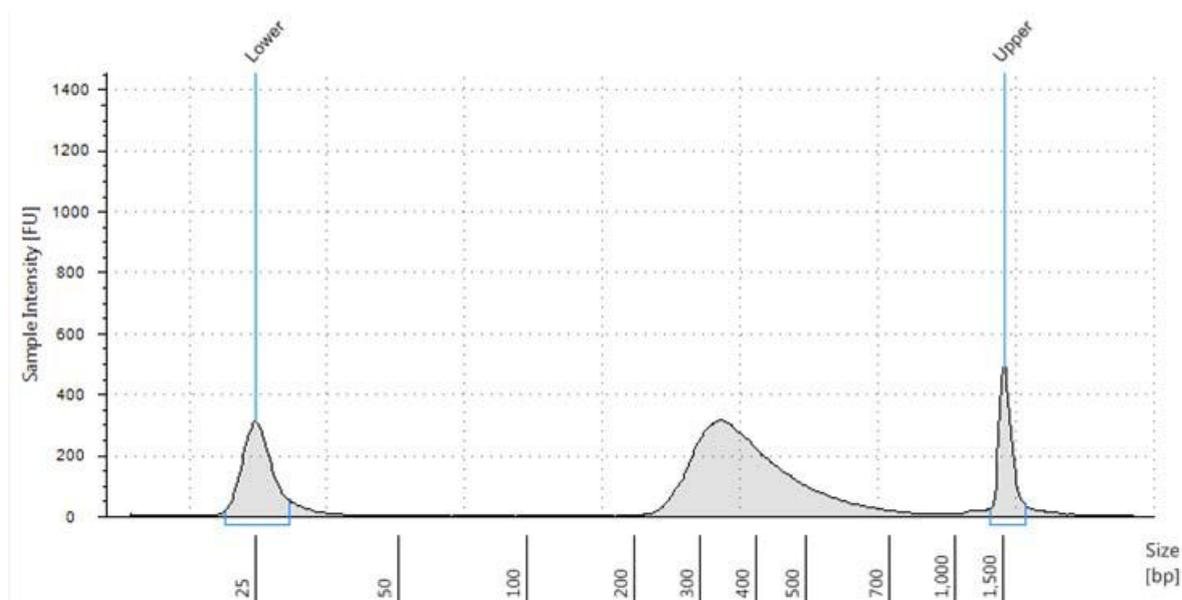


図 12 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation と High-Sensitivity D1000 ScreenTape による泳動図。250 - 350 bp 付近の位置にピークトップを持つスメアピークがあることを確認します。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

### STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

最適なクラスタ密度はお使いのイルミナ社シーケンサの機種やVersionによって異なりますので、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ください。本プロトコルに記された DNA の最終的な濃度は、イルミナ社のアップデートにより変わることがありますので、事前にご確認ください。

1. プールするサンプルはモル濃度が等しくなるように正確に混ぜる必要があります。下記の式により、インデックスバーコードサンプルをプールするための量を計算します。

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

V(f) : プールしたサンプルの最終的な必要量

C(f) : プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例: Methyl-Seq シーケンシングプロトコルでは 2 nM

# : プールするインデックスバーコードタグの数

C(i) : 各インデックスサンプルの初期濃度

2. 最終的に必要な液量になるように調整を行います。
  - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量 V(f) より少ない場合、Low TE Buffer を用いて総量が V(f) になるように調整します。
  - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量 V(f) より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して V(f) とします。

表 27 に 2 つのインデックスタグ(それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。最終的な容量 25  $\mu$ L (10 nM の濃度) にするには Low TE を用います。

表 27 トータル量 25  $\mu$ L、終濃度 10 nM にするためのインデックスタグ付き Methyl-Seq サンプルの混合例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use ( $\mu$ L)
Sample 1	25 $\mu$ L	10 nM	10 nM	2	12.5
Sample 2	25 $\mu$ L	12.5 nM	10 nM	2	10
Low TE					2.5

3. プールに加えたインデックス付きライブラリのいずれかでプライマーダイマーのピークが検出された場合、71 ページの「STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製」を 45  $\mu$ L の AMPure XP ビーズ懸濁液と 25  $\mu$ L のシーケンシングサンプルを用いて繰り返してください。精製した DNA は 25  $\mu$ L の nuclease-free 水で溶出させます。

## STEP5. Agilent 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation によるインデックス付き DNA プールの定量とサイズ確認

1. P.72 を参照し、バイオアナライザもしくは TapeStation でインデックス付き DNA プールの定量とサイズ確認を実施します。
2. 結果をチェックします。約 250 bp から 350 bp の間にシングルピークのピークトップがあることを確認します。また PCR の非特異的増幅産物がないかどうか確認します。
3. バイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いてピークの濃度を測定します。インデックス付き DNA プールの濃度は 10 nM になるはずですが。
4. template の変性とフローセル調製に進んでください。イルミナ社の適切なプロトコルを参照してください。

使用するフローセルのキャパシティと解析パイプラインのバージョンにより、ライブラリプールの希釈と処理が変わります。イルミナ社の適切な取扱説明書を参照してください。

## 6. インデックスタグ付加とマルチプレックスシーケンシングのためのサンプルのプール

### シーケンスランセットアップのためのガイドライン

イルミナ社の適切な Paired-End Cluster Generation Kit を用いて、クラスタ増幅を行ってください。

アジレント社 R&D でのテストランにおいては、推奨シード濃度 (seed concentration) は 15 pM です。目的に応じて、適切な濃度でクラスタ形成を行うようにしてください。ライブラリのプールのための希釈とプール方法は、フローセルのキャパシティと分析のパイプラインによって異なります。必ずイルミナ社の適切なプロトコルを参照ください。

#### NOTE

- Methyl-Seq サンプルの塩基組成はバイアスがかかっています。HCS v2.0.12 を用いている装置では、コントロールレーンの必要がありません。ご使用の装置の HCS の Version が v2.0.12 以前の場合は、PhiX DNA のような塩基組成にバイアスがないサンプルを使用して、コントロールレーンでの解析を行ってください。

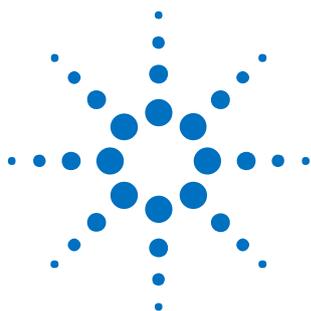
### 8-bp インデックスタグ付加ライブラリのためのシーケンシングランセットアップガイドライン

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

表 28 HiSeq プラットフォーム Run Configuration スクリーン Cycle Number 設定\*

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

\* 設定は v3.0 SBS ケミストリーの場合



## 7. リファレンス

試薬一覧 80

SureSelect Indexes の塩基配列 83

Methyl-Seq データ解析について 84

この章では、リファレンス情報について説明します。

### CAUTION

本リファレンス情報は、p/n **5500-0128** もしくは **5500-0129** (2015年1月下旬以降の出荷)の番号が付いたライブラリ調製キットに対応しています。必ず、ライブラリ調製キットに貼られたラベルの番号を確認ください。

お手持ちのライブラリ調製キットの部品番号が **5500-0107** もしくは **5500-0108** の場合は、**本プロトコルではなく、Version B.1 [2014年8月版 和文]**を参照してください。これらのキットは、試薬が異なるため、本リファレンスを参照いただくことができません。

## 7. リファレンス

### 試薬一覧

SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq キットは、室温保存品、-20°C保存品、-80°C保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管してください。

また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うように注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 29 SureSelect<sup>XT</sup> Methyl-Seq Kit 構成試薬一覧

Product	Storage Condition	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit	-20°C	5500-0128	5500-0129	5x5500-0129
SureSelect Methyl-Seq Target Enrichment Box 1	Room Temperature	5190-5000	5190-5002	5x5190-5002
SureSelect Methyl-Seq Hybridization Kit Box 2	-20°C	5190-5001	5190-5003	5x5190-5003
SureSelect Human Methyl-Seq Capture Library	-80°C	5190-4661	5190-4662	5190-4663

表 29 に示したキット構成試薬一覧の詳細を次の表に示します。

表 30 SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit 構成試薬内訳

Kit Component	16 Reactions	96 or 480 Reactions
10X End Repair Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap
10X Klenow Polymerase Buffer	tube with blue cap	tube with blue cap
5X T4 DNA Ligase Buffer	tube with green cap	tube with green cap
T4 DNA Ligase	tube with red cap	tube with red cap
Exo(-) Klenow	tube with red cap	tube with red cap
T4 DNA Polymerase	tube with purple cap	tube with purple cap
Klenow DNA Polymerase	tube with yellow cap	tube with yellow cap
T4 Polynucleotide Kinase	tube with orange cap	tube with orange cap
dATP	tube with green cap	tube with green cap
dNTP Mix	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Methyl-Seq PCR Master Mix	tube with clear cap	bottle
SureSelect Methyl-Seq Methylated Adapter	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Methyl-Seq PCR1 Primer F	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect Methyl-Seq PCR1 Primer R	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect Methyl-Seq Indexing Primer Common	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect <sup>XT</sup> Indexes, 8 bp reverse primers*	SSEL 8 bp Indexes A01 through H02, provided in 16 white-capped tubes	SSEL 8 bp Indexes A01 through H12, provided in blue 96-well plate <sup>†</sup>

\* インデックス配列については、次ページ以降をご参照ください。

表 31 SureSelect Methyl-Seq Target Enrichment- Box 1 構成試薬内訳

Kit Component	16 Reactions	96 or 480 Reactions
SureSelect Hyb 1	tube with orange cap	bottle
SureSelect Hyb 2	tube with red cap	tube with red cap
SureSelect Hyb 4	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle
SureSelect Elution Buffer	tube with blue cap	bottle

Box1 中には、SureSelect Neutrization Buffer も含まれますが、使用しません。

## 7. リファレンス

表 32 SureSelect Methyl-Seq Target Enrichment- Box 2 構成試薬内訳

Kit Component	16 Reactions	96 or 480 Reactions
SureSelect Hyb 3	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Indexing Block 1	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Block 2	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect Methyl-Seq Block 3	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap

表 33 SureSelect Methyl-Seq Library Prep Kit 5500-0129 に含まれている青色 96 ウェルプレートの 8 bp インデックス A01-H12 までのマップ

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

表 34 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は白色キャップのチューブ A01-H02、  
96 反応は青色プレート A01-H12)

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

## 7. リファレンス

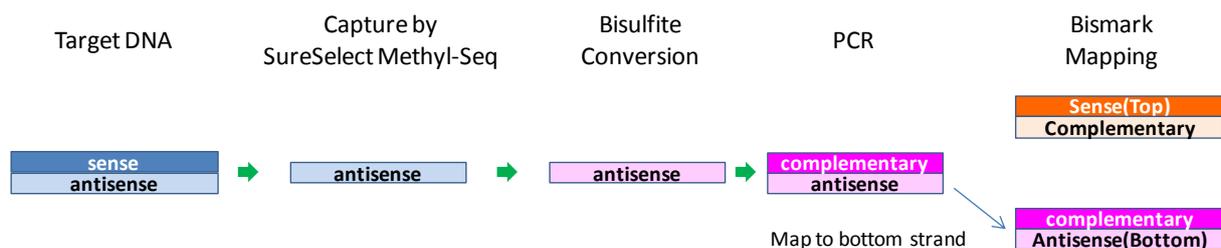
### Methyl-Seq データ解析について

アジレント・テクノロジーの SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのカatalogキットは、ターゲットとする gDNA のアンチセンス鎖をキャプチャします。カスタムキットの場合は、どちらの Strand をキャプチャするのか、デザインの過程で選択できます。カスタムキットのデザイン時に Strand を Sense として設定すると、キャプチャするベイト(プローブ)がセンス鎖の配列となり、アンチセンス鎖をキャプチャします。

全エクソンキットなど、Methyl-Seq 以外の SureSelect では、キャプチャしたアンチセンス鎖を鋳型として PCR を行い、その両鎖がシーケンスされるので、キャプチャする Strand は問題となりませんが、バイサルファイトシーケンスの場合以下の点が異なります。

キャプチャを行わない全ゲノムバイサルファイトシーケンスでは、DNA のセンス鎖、アンチセンス鎖がそれぞれバイサルファイト変換されます。この変換は、メチル化されていない C を最終的に T に置き換える変換のため、バイサルファイト後は、センス鎖とアンチセンス鎖が相補ではない配列となります。それぞれの配列に対して、PCR で相補鎖が作られ、シーケンスされます。Bismark では、センス鎖由来のバイサルファイト変換配列がセンス鎖の C to T に、アンチセンス鎖由来のバイサルファイト変換配列がセンス鎖の G to A に(アンチセンス鎖の C to T と同義)マッピングされ、バイサルファイト変換でそれぞれ異なる配列になった Strand が区別できるようになっています。

Agilent Methyl-Seq は、ターゲットの gDNA のアンチセンス鎖のみをキャプチャしています。その後バイサルファイト変換処理を行い、さらに PCR をかけて、変換されたアンチセンス配列の相補鎖が作られています。よって、得られた配列は、そのほとんどが結果として G to A の配列となり、アンチセンス側(Converted Bottom Strand)にマッピングされます。このため、アジレントの Methyl-Seq の Read はそのほとんどが Converted Bottom Strand に Mapping されるのは正常な現象です。



参考資料: Agilent SureSelectXT Human Methyl-Seq for the Quantitative Analysis of DNA Methylation with Single-Base Resolution  
Technical Overview, May 10, 2012, 5991-0166EN

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。万が一不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

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

#### 分析結果に基づく損失

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

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

#### 保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

**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](mailto: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。