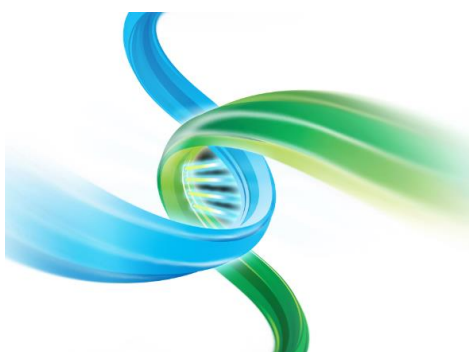
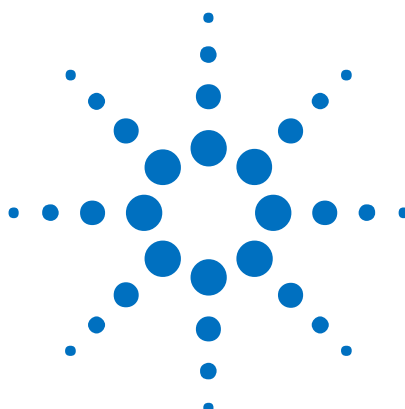




アジレント SureSelect^{QXT} ターゲットエンリッチメントシステム イルミナマルチプレックスシーケンス対応

トランスポゼースを用いたライブラリ調製法

本プロトコルは **SureSelect QXT 全ゲノムシーケンス用プロトコル** 及び **SureSelect XT プロトコル** とは異なります。ご注意ください。

和文プロトコル

Protocol Version D.0 対応

[2017 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、最新の英語版を参照くださる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^{QXT} Target Enrichment System

for Illumina Multiplexed Sequencing

Version D0, November 2015

G9681-90000

に対応しています。

このプロトコルでは、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アジレント SureSelect^{QXT} Target Enrichment System のサンプル調製キットを用い、ゲノムの中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ビオチン化 RNA オリゴマーライブラリ(プローブ)を使って、ターゲットとするゲノム DNA の領域を、リピート配列やターゲット領域以外のシーケンスを除いて濃縮するために開発、最適化されています。
SureSelect^{QXT} キットを用いて、全ゲノム解析用のライブラリを調製する場合、本プロトコルではなく、G9682-90000 に相当する和文プロトコルをご参照下さい。

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^{QXT} キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。サンプルは個別にキャプチャを行い、キャプチャ後にインデックスを付けてプールするポストプール対応のプロトコルです。プレプール、シングルエンド、マルチプレックスではないペアエンド、メイトペアシーケンス、その他のライブラリには対応していませんので、ご注意ください。

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

email_japan@agilent.com

これまでのバージョンでの変更点

Ver. D0 での変更点(2016 年 6 月)

- NextSeq 500 v2 プラットフォームに対するカスタムシーケンスプライマーの準備方法をアップデートしました。
- NextSeq 500 プラットフォームで BaseSpace を用いてランする際の P5 Index 配列についてアップデートしました。
- イルミナ Cluster Generation キット 選択ガイドをアップデートしました。
- 利用可能なキャプチャライブラリの種類をアップデートしました。

Ver. C0 での変更点(2014 年 8 月)

- Illumina の NextSeq プラットフォーム用の、SureSelect QXT NSQ 試薬キットに対応しました。キットの内容については表 27、表 28、表 29、表 30、表 31 を参照してください。
- MiSeq プラットフォームでのカスタムシーケンスプライマーの準備方法をアップデートしました。
- 利用可能なキャプチャライブラリの種類をアップデートしました。
- Wash のステップを変更し、すべてのサイズのキャプチャライブラリに共通のプロトコルとなりました。
- クイックレファレンスガイドを更新し、SureSelect QXT のキャプチャ・wash プロトコルの変更、SureSelect XT のプロトコル変更に対応しました。

Ver. B2 での変更点

- Focused Exome キャプチャライブラリに対応しました。
- SureSelect QXT P5, P7 インデックスプライマーの番号と Illumina のインデックス番号の対応を記載しました。
- SureSelect のプロトコルの相違を Quick Reference Guide to SureSelect Protocol Difference にまとめました。

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. サンプルの調製

この章では、ターゲット領域の濃縮に用いる gDNA サンプルからのライブラリ調製のステップについて説明しています。

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

この章では、調製した DNA ライブラリの、SureSelect キャプチャライブラリを用いたハイブリダイゼーションとキャプチャのステップについて説明しています。

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

この章では、ハイブリダイゼーション後のサンプルの増幅と Sequencing サンプルの準備のステップについて説明しています。

5. 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。

目次

1. はじめに 6

- 操作に関する注意 8
- 安全に関する注意 9
- 実験に必要な試薬 10
- 実験に必要な装置、消耗品類 13

2. サンプルの調製 15

- STEP1. Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加 16
- STEP2. AMPure XP ビーズによるアダプター付加 gDNA ライブラリの精製 20
- STEP3. アダプター付加 gDNA ライブラリの増幅 22
- STEP4. AMPure XP ビーズによる増幅された gDNA ライブラリの精製 24
- STEP5. 電気泳動による gDNA ライブラリのサイズチェックと定量 26

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ 30

- STEP1. ハイブリダイゼーションに用いるアダプター付き gDNA ライブラリの分注 31
- STEP2. アダプター付き gDNA ライブラリと SureSelect キャプチャライブラリのハイブリダイゼーション 32
- STEP3. DNA ハイブリッドキャプチャのためのストレプトアビジン磁気ビーズの調製 36
- STEP4. SureSelect キャプチャライブラリとハイブリダイズした DNA の回収 37

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製 40

- 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 41
- STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 45
- STEP3. 電気泳動によるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認 47
- STEP4. 定量 PCR によるインデックスタグ付きキャプチャライブラリの定量(オプション) 51
- STEP5. 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 52
- STEP6. クラスタ増幅のためのサンプル調製 54
- STEP7. Sequencing Run のセットアップと Read からのアダプタートリミング 58

5. リファレンス 61

- 試薬一覧 62
- SureSelect QXT Dual Index の塩基配列 64
- Dual Index 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン 66
- SureSelect 各プロトコルの違いについてのクイックリファレンス 68

1. はじめに

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。

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。SureSelect キャプチャライブラリとその試薬は納品後 1 年以内にご使用頂きますようお願いいたします。

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操作してください。

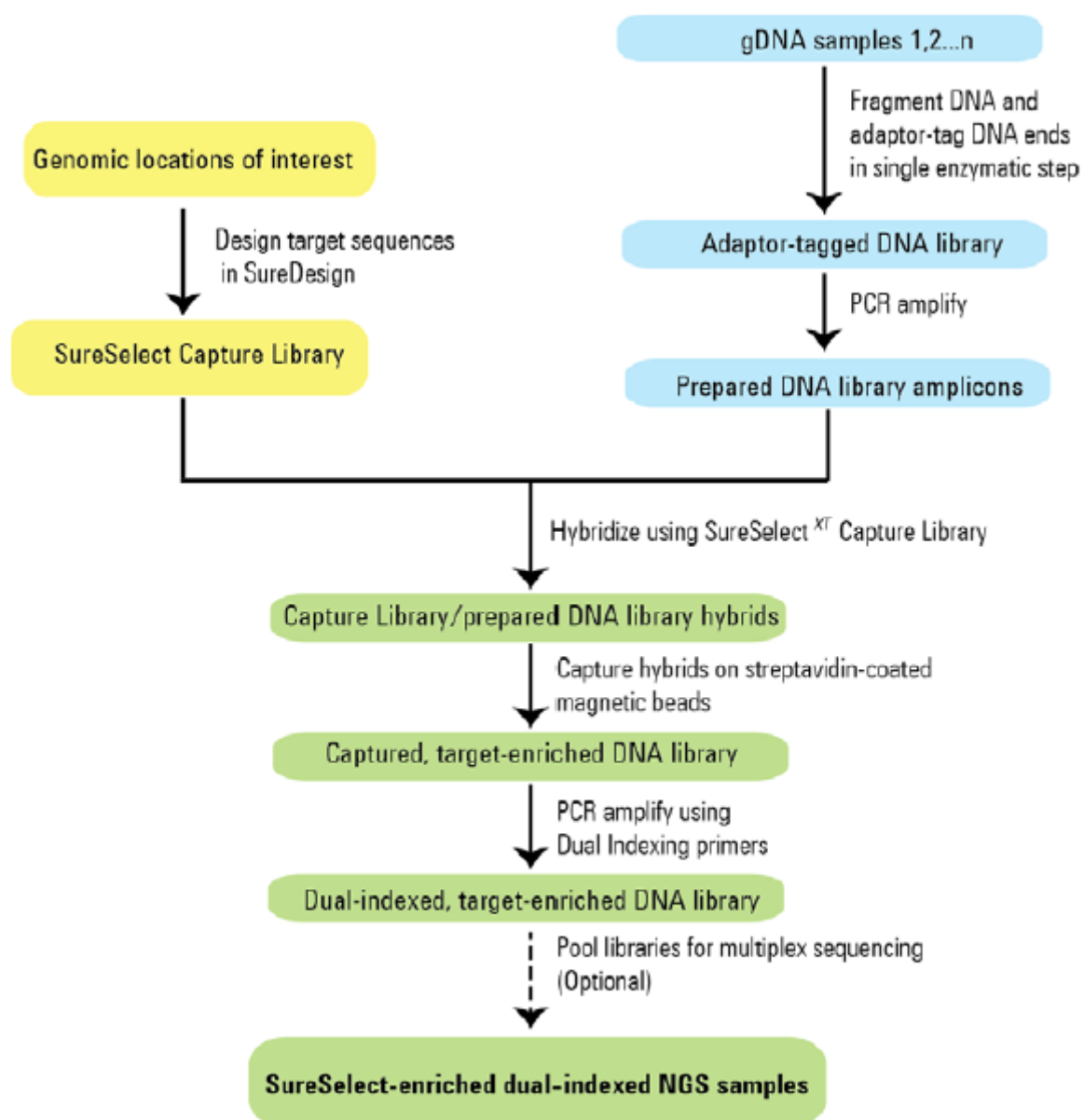


図 1 ターゲットエンリッチメント Sequencing のためのサンプル調製ワークフロー

1. はじめに

操作に関する注意

- SureSelect^{QXT} システムでは、最良の結果を得るためには高品質の DNA サンプルが必要です。実験を開始する前に、DNA の品質を確認して下さい。凍結融解の繰り返しは DNA の品質を下げるため、希釈された DNA は 4°C で保管し、凍結を避けることが理想的です。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。
- SureSelect^{QXT} によるライブラリ調製プロトコルのパフォーマンスは、DNA サンプルとその他の試薬成分の量のばらつきによって影響を受けます。本プロトコル p.
PAGEREF _Ref390869202 ¥h 17 に記載してあるように、DNA サンプルを正確に定量し、希釈をすることが重要です。全ての反応試薬は注意深く測り取り、p18
.に記載してあるように混合して下さい。正確な量を測り取るために、定期的なピペットのキャリブレーションなど、正確な Liquid Handling を心がけて下さい。

- SureSelect^{QXT} キットに含まれている酵素のマスターミックスは、注意して取り扱って下さい。チューブを -20°C 保管から取り出した後、使用中は氷上もしくはコールドブロック中に置いて下さい。使用後はすぐに -20°C のフリーザーに戻して下さい。
- チューブのストリップキャップを外す必要があるステップでは、再度キャップをする際には新しいストリップキャップを使用して下さい。キャップはサーマルサイクラの Heated Lid に触れる、その他の実験操作などにより変形することがあります。ストリップキャップを再利用することでサンプルをロスしたり、サンプルのコンタミネーションを招いたり、サーマルサイクラでのインキュベーション中にサンプル温度が不正確になったりする可能性があります。
- 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、消耗品と試薬を使用します。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ます。PCR 前の過程ではコンタミネーションのリスクが高いため、10%漂白液で日常的に実験デスクなどを拭き清めて下さい。
 3. PCR 前の溶液専用のピペッタには、ヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用します。
 4. パウダーフリーのラボ用手袋を着用し、表面がコンタミネーションする可能性のあるものに接触したら必ず新しい手袋に替えてください。
- ・ サンプルを-20℃で保管可能な Stopping Point は、プロトコルに記載されています。保管の際は、何回にも渡る凍結融解を繰り返さないようにご注意ください。
 - ・ 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。
 - ・ 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。

1. はじめに

実験に必要な試薬

下記の表は以下のウェブサイトから pdf ファイルをダウンロードすることができます。

<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 SureSelect QXT で使用可能なキャプチャライブラリリスト

SureSelect XT キャプチャライブラリ (ベイト)		マニュアル用		自動化用
		16反応分	96反応分	96反応分
SureSelect XT Human All Exon V6	Agilent	5190-8863	5190-8864	5190-8865
SureSelect XT Human All Exon V6 + UTRs	Agilent	5190-8881	5190-8882	5190-8883
SureSelect XT Human All Exon V6 + COSMIC	Agilent	5190-9307	5190-9308	5190-9309
SureSelect XT Human All Exon V5	Agilent	5190-6208	5190-6209	5190-6210
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs	Agilent	5190-6213	5190-6214	5190-6215
SureSelect XT Human All Exon V5+lncRNA	Agilent	5190-6446	5190-6447	5190-6448
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory	Agilent	931071	931072	931073
SureSelect XT Focused Exome	Agilent	5190-7787	5190-7788	5190-7789
SureSelect XT Clinical Research Exome	Agilent	5190-7338	5190-7339	5190-7344
SureSelect XT Mouse All Exon	Agilent	5190-4641	5190-4642	5190-4643
SureSelect XT Mouse All Exon V2 (mm10 対応)	Agilent	EA	EA	EA
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb	Agilent	5190-4806	5190-4807	5190-4808
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 再発注	Agilent	5190-4811	5190-4812	5190-4813
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb	Agilent	5190-4816	5190-4817	5190-4818
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4821	5190-4822	5190-4823
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb	Agilent	5190-4826	5190-4827	5190-4828
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4831	5190-4832	5190-4833
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb	Agilent	5190-4836	5190-4837	5190-4838
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4841	5190-4842	5190-4843
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb	Agilent	5190-4896	5190-4897	5190-4898
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb, 再発注	Agilent	5190-4901	5190-4902	5190-4903
ClearSeq キャプチャライブラリ (ベイト)				
ClearSeq SS Comprehensive Cancer	Agilent	5190-8011	5190-8012	5190-8013
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ	Agilent	5190-7518	5190-7519	5190-7520
ClearSeq SS DNA Kinome	Agilent	5190-4646	5190-4647	5190-4648

表 2 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
SureSelect QXT 試薬キット						
SureSelect QXT Reagents, 16反応, イルミナ対応	Agilent	G9681A	-	1	16反応分	
SureSelect QXT Reagents, 96反応, イルミナ対応	Agilent	G9681B	-	1	96反応分	
SureSelect QXT Reagents, 16rxn, イルミナNextSeq対応	Agilent	G9683A	-	1	16反応分	
SureSelect QXT Reagents, 96rxn, イルミナNextSeq対応	Agilent	G9683B	-	1	96反応分	
その他の試薬						
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
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	162 μ L	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 μ L	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当		100 mL	最後のライブラリのプール時に必要であれば使用します。
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当		500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当			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				1.2 mL		上記99.5% Ethanolから調製します
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	指定			スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies	Q32851	指定			BRアッセイでは感度が足りないgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
※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	1ランで最大21サンプルまで定量することができます。
※お持ちの電気泳動装置に応じ、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。						
Agilent 4200 / 2200 TapeStation消耗品						
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、アガローゼ電気泳動の代わりに使用できます。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	1ラン	25ラン分	
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1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。

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※アジレントの SureSelect 製品 (SureSelect XT キャプチャライブラリおよび SureSelectQXT 試薬) の保証期間は納品後1年間です。その他のアジレント製品の試薬の保証期間は3ヶ月ですので、保証期間内にご使用下さいますよう、ご注意ください。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。

※試薬はそれぞれの反応数分がはいっています。

1. はじめに

※SureSelect XT キャプチャライブラリ(プローブ)のカスタムデザインを eArray・SureDesign で行った場合は、デザイン ID(ELID)が、ご自身でデザインし、オーダーしたものと同一であることを確認してください。オリゴキャプチャライブラリのデザイン ID は、チューブラベルおよびチューブの入った箱のラベルに記載されています。

実験に必要な装置、消耗品類

表 3 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	内容量	備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。						
Agilent 4200 TapeStation System	Agilent	G2991AA	指定			DNAの定性または定量に使用することができます。
Agilent 2200 TapeStation	Agilent	G2964AAまたは G2965AA	指定			DNAの定性または定量に使用できます
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定			DNAの定性または定量に使用できます。 Expert Software B.02.07以降が必要
Qubit®2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	指定			スタート時のgDNAを正確に定量するために使用
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当			プロトコルに記載のハイブリ条件で、 30 µLの液が26 µL以下まで蒸発しないこと (HotTop使用)
MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003319000	相当			ストレプトアビジンビーズ溶液がウェル内でよく混ざるように、1,800 rpm程度でMix可能なもの。フルスカート以外のPCRプレートや8連チューブで使用する場合は別売りのPCRプレートアダプタメントが必要。
MS3.5 96ウェルプレート用アダプタメント	IKA	0003428000	相当			フルスカート以外のPCRプレートや8連チューブ使用時に上記MS3デジタルに装着して使用
Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート用) または日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	Life Technologies または 日本ジェネティクス	96ウェルプレート用 120-27, 8連チューブ用 FG-SSMAG2	相当			96ウェルプレート用マグネット。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。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)。
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plates またはoptical strip tubes	Agilent	410088 または 410092	相当		Tube 120 本 Plate 25 枚	使用するサーマルサイクラーに対応した消耗品をご使用下さい
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当		120本	使用するサーマルサイクラーに対応した消耗品をご使用下さい
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	4306311	相当		100 films	96ウェルプレートを使用する場合、キャップの代わりにシールを用いることもできますが、ハイブリの際に液が蒸発してしまわないか事前にチェックをして下さい
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
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当		250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用ください。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
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						
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	日本ミリボア	チビタンII	相当			
8連チューブ用遠心器	和研ビーテック	ブチハチ	相当			8連チューブを使用する場合スピンドアウに必要
96ウェルプレート 遠心器	KUBOTA	PlateSpin II	相当			96ウェルプレートを使用する場合スピンドアウに必要
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
濃縮遠心機 (96well plate用ローター付き)	Savant	SC210A	相当			gDNAサンプルが100 ng/µLより低濃度である場合、濃縮の必要があります
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。

1. はじめに

※ハイブリダイゼーションに用いる PCR 装置、チューブまたは 96well-plate とキャップ、シールは、必ず事前に 30 ul の液が 26ul 以下に蒸発しないことを確認してから使用してください。



2. サンプルの調製

この章では、ターゲットエンリッチメントの前に、イルミナプラットフォームで Sequencing を行うためのゲノム DNA(gDNA)の Sequencing ライブラリを調製する方法を記載しています。

マルチプレックスシーケンスを行うためのサンプルは、まずそれぞれ、個別にライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、キャプチャを行います。キャプチャ後のサンプルを PCR 増幅するときに、あわせてインデックス配列を各サンプルに付加します。SureSelect でキャプチャするターゲット領域のサイズに応じて、1 レーンあたり最大 96 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスを行います。

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。

2. サンプルの調製

STEP1. Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加

このステップでは、単一の反応により、gDNA を酵素反応により断片化し、各フラグメントの両端にアダプターを付加します。このステップでは、表 4 に示された SureSelect^{QXT} 試薬キットに含まれる試薬と、その他のベンダーの試薬(表 1 参照)を使用します。

表 4 DNA の断片化とアダプター付加の試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect QXT Stop Solution	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, Room Temperature	p.16
SureSelect QXT Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p.18
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p.18

以下のステップを開始する前に、[SureSelect QXT Enzyme Mix ILM](#) と [SureSelect QXT Buffer](#) のチューブを、保管してある-20°Cのフリーザーから取り出し氷上に置いて下さい。各試薬は使用前にボルテックスでしっかりと攪拌して下さい。AMPure XP ビーズを 4°Cから出し、室温に置いて下さい。

NOTE

本ステップで使用する試薬を準備すると同時に、[SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2](#) に含まれる [DMSO](#) のチューブも、-20°Cから出して置いて下さい。DMSO のチューブは p.22 で使用するまで、室温にて保管して下さい。

シーケンスを行うgDNAサンプルごとに、1ライブラリを調製します。12サンプルをシーケンスする場合は、12ライブラリを調製することになります。

1. [SureSelect QXT Stop Solution](#) の容器のラベルと以下の説明を確認し、本試薬がエタノールを 25 %含むことを確認して下さい。

容器を開封して最初に使用する前に、4.5 mL の Stop Solution を含む試薬ボトルに 1.5 mL の 100 %エタノールを加え、最終エタノール濃度が 25 %になるように調製します。ボトルの蓋をきっちりと閉め、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。エタノールを加えた後は、後で使用する際にエタノール添加済みであることが明確に分かるように、ラベルに印を付けて置いて下さい。

調製済みの [1x SureSelect QXT Stop Solution](#) は p.19 で使用するまで、蓋をきっちりと閉めて室温にて保管します。

2. p.20 と p.24

の精製ステップのための試薬を準備します。

- a. 使用する分の AMPure XP ビーズを室温に戻します。使用する少なくとも 30 分以上前に、ビーズを室温に出しておく必要があります。保管時も含め、決して凍らせないようにしてください。
 - b. 精製で使用する 70%エタノールを、1 サンプルにつき 800 μ L (+余剰分)、用時調製します。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内に使い切ることを推奨します。
3. gDNA サンプルを、以下に示すように二段階の手順で、蛍光検出器 Qubit により定量・希釈します。
- a. Qubit dsDNA BR Assay または Qubit dsDNA HS Assay を用いて、各 gDNA サンプルの初期濃度を測定します。Qubit の取り扱い説明書を参照して下さい。最適な断片化結果のためには gDNA を正確に定量し、適切な量を用いる必要があります。そのためにこの二段階の希釈ステップは、非常に重要です。
 - b. DNA の吸着が起きにくい LoBind の 1.5 mL チューブを用いて、Nuclease-free 水で各 gDNA サンプルを 100 ng/ μ L の濃度に希釈します。
 - c. 再度 Qubit dsDNA BR Assay を用いて、100 ng/ μ L に調整した gDNA サンプルの濃度を注意深く正確に測定します。
 - d. c で再測定した濃度をもとに、LoBind の 1.5 mL チューブを用いて、Nuclease-free 水で各 gDNA サンプルの最終的な濃度を 25 ng/ μ L に調整して下さい。

CAUTION

最適な結果を得るためには、DNA 断片化の時間と温度を正確にコントロールする必要があります。断片化反応の準備を開始する前に、サーマルサイクラが次のステップ 4 に記載の通り設定されていることを確認して下さい。表 5 に記載されている通り、**45°Cでは 10 分を超過しないようにご注意ください。**

4. SureCycler 8800 サーマルサイクラ、もしくは相当するサーマルサイクラで、表 5 に示すプログラムを設定します。Heated Lid は On にします。プログラムをスタートさせて直後に Pause を押し、断片化反応の準備をしている間に Heated Lid が指定の温度に達するようにします。

表 5 DNA 断片化のサーマルサイクラプログラム

2. サンプルの調製

Step	Temperature	Time
Step 1	45°C	10 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

5. 氷上にある [SureSelect QXT Buffer](#) と [SureSelect QXT Enzyme Mix ILM](#) を高速設定のボルテックスミキサでよく混合してスピンドウンした後、氷上に置きます。[SureSelect QXT Buffer](#) は極めて粘性が高いため、完全に且つしっかりと混合することが最適な断片化のためには極めて重要です。これらの試薬は-20°Cから取り出した時点で液体であり、次のステップ 6 で使用した後はすぐに-20°Cに戻して下さい。

CAUTION

以下のステップでは、使用する試薬の僅かな量のばらつきでも、DNA 断片のサイズのばらつきをもたらす可能性があります。

[SureSelect QXT Buffer](#) と [Enzyme Mix](#) は、極めて粘性が高い溶液です。以下のステップで示されている、分注および混合の方法に沿って実験するようにご注意ください。最善の結果を得るためには、各試薬および反応溶液を完全に均一に混合することが極めて重要です。

6. 96 ウェル PCR プレートか 8 連ストリップチューブを用いて、氷上で断片化反応溶液を調製します。反応液を構成する各試薬は、以下に示す通りの順序で加える必要があります。[SureSelect QXT Buffer](#) と [Enzyme Mix](#) はプレミックスにしないで下さい。
- 各サンプルウェルに、17 μ L の [SureSelect QXT Buffer](#) を加えます。
 - [SureSelect QXT Buffer](#) を入れた各ウェルに、ステップ 3 で 25 ng/ μ L に調整した各 gDNA サンプル 2 μ L を加えます。DNA を分注する際、ピペットチップをウェルの底につけて DNA を吐出するように、注意して下さい。
 - 2 μ L の [SureSelect QXT Enzyme Mix, ILM](#) を各サンプルウェルに加えます。Enzyme Mix を分注する際、ピペットチップをウェルの底につけて試薬を吐出するように、注意して下さい。2 μ L の Enzyme Mix を吐出した後、8-10 回ピペッティングで溶液のアップダウンを行い、粘性の高い試薬溶液がピペットチップに残らず、完全にウェル内に移されるようにして下さい。この時点でウェル内の溶液の合計量は 21 μ L になります。
7. ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、ストリップチューブまたはプレートごと高速設定のボルテックスミキサで 20 秒間攪拌し、反応溶液が完全に混ざるようにします。
8. サンプルをスピンドウンし、すぐにストリップチューブまたはプレートを Pause してある SureCycler 8800 などのサーマルサイクラにセットします。Play ボタンを押し、Pause させていた表 5 のサーマルサイクリングプログラムを再開させて下さい。

9. サーマルサイクラ中で 10 分間サンプルをインキュベーションしている間に、p.20 で使用する AMPure XP ビーズをボルテックスミキサでしっかり攪拌し、均一にして下さい。
10. サーマルサイクラが 4℃ 1 分間のインキュベーションを完了したらすぐサンプルを氷上に移し、速やかに下のステップ 11 に進んでください。
11. 32 uL の **1X SureSelect QXT Stop Solution**(25%のエタノールを含む状態)をそれぞれの断片化反応液に加えます。ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、高速設定のボルテックスミキサで 5 秒間混合します。軽くスピンドウンして液をウェルの底に集めます。
サンプルを室温で 1 分間インキュベーションします。すぐに p.20 の精製プロトコルに進んで下さい。

2. サンプルの調製

STEP2. AMPure XP ビーズによるアダプター付加 gDNA ライブラリの精製

使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4℃保存)を室温に戻しておくようにします。
サーマルサイクラを 37℃に設定しておきます。

下のステップ 6 で使用する 70%エタノールが必要量あることを確認します。

1. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
2. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 **52 uL** を、DNA サンプルが入った各ウェルに加えます。
ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、ストリップチューブまたはプレート を 5 秒間ボルテックスでよく混合し、軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

ビーズ溶液の状態や色がサンプルウェル内で均一であることを確認して下さい。ビーズの層や透明な液体のみの箇所が存在せず、均一な色である必要があります。
3. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
4. チューブまたはプレート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 (3-5 分間程度)。
5. チューブまたはプレート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ます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
6. チューブまたはプレート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ウェルに 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%エタノールは用時調製して下さい。
7. 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 70%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、廃棄します。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。各 Wash ステップで、確実にエタノールが取り除かれるようにして下さい。
9. 37℃にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1-3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
10. **11 uL** の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
11. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
12. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
13. チューブまたはプレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。
この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
14. 上澄み液 約 10 uL を新しいウェルに移し、氷上に置きます。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

STEP3. アダプター付加 gDNA ライブラリの増幅

このステップでは、アダプター付加された gDNA ライブラリを修復し、PCR 増幅をかけます。

- 以下の表にある試薬を溶解し、ボルテックスミキサでよく混合した後、DMSO 以外を氷上に置きます。DMSO は引き続き室温に置きます。以下の表に示す通り、SureSelect QXT Primer Mix のみ SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2 ではなく SureSelect QXT Hyb Module Box 2 に入っています。Library Prep Kit Box 2 には他の用途に用いる別の Primer が複数あるため、間違えないように注意して下さい。

表 6 Pre Capture PCR 増幅に使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p.22
5× Herculase II Reaction Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p.22
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p.22
SureSelect QXT Primer Mix	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, -20°C	p.22
DMSO	Transferred to Room Temperature storage on p.16	p.22

- 以下表に記載されているように、氷上で必要量の PCR 反応ミックスを作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリあたり約 1.06 倍の量で計算されています。ボルテックスミキサでよく混合します。

表 7 Pre Capture PCR 反応ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	25 µL	425 µL
5× Herculase II Reaction Buffer	10 µL	170 µL
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	0.5 µL	8.5 µL
DMSO	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect QXT Primer Mix	1 µL	17 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL	17 µL
Total	40 µL	680 µL

- 上のステップ 2 で調製した Pre Capture PCR 反応ミックスを 40 uL、精製された各 DNA ライブラリサンプル 10 uL に加えます。

ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、ボルテックスで 5 秒間穏やかに攪拌します。サンプルを軽くスピンドウンし、溶液をウェルの底に集めます。

4. チューブまたはプレートをサーマルサイクラにセットし、表 8 のプログラムを開始します。Heated Lid は On にします。

表 8 Pre Capture PCR のサーマルサイクラプログラム

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	68°C	2 minutes
2	1	98°C	2 minutes
3	8	98°C	30 seconds
		57°C	30 seconds
		72°C	1 minute
4	1	72°C	5 minutes
5	1	4°C	Hold

2. サンプルの調製

STEP4. AMPure XP ビーズによる増幅された gDNA ライブラリの精製

使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4℃保存)を室温に戻しておくようにします。
サーマルサイクラを 37℃に設定しておきます。

下のステップ 6 で使用する 70% エタノールが必要量あることを確認します。

1. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
2. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 **50 uL** を、DNA サンプル 50 uL が入った各ウェルに加えます。**ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ストリップチューブまたはプレート を 5 秒間ボルテックスでよく混合し、軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

ビーズ溶液の状態や色がサンプルウェル内で均一であることを確認して下さい。ビーズの層や透明な液体のみの箇所が存在せず、均一な色である必要があります。

3. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
4. チューブまたはプレート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 (3-5 分間程度)。
5. チューブまたはプレート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ます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
6. チューブまたはプレート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ウェルに 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。
7. 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 70%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、廃棄します。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。各 Wash ステップで、確実にエタノールが取り除かれるようにして下さい。
9. 37℃にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1-3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
10. **13 uL** の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
11. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
12. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
13. チューブまたはプレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
14. 上澄み液 約 13 uL を新しいウェルに移します。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、このサンプルはウェルを密封して短期間であれば 4°C で、長期であれば -20 °C で保管することができます。

2. サンプルの調製

STEP5. 電気泳動による gDNA ライブラリのサイズチェックと定量

精製、増幅したアダプター付き gDNA ライブラリのサイズと濃度を、バイオアナライザ DNA1000 アッセイもしくは 2200 TapeStation を用いて測定します。

【Option 1: バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使う場合】

NOTE

磁性ビーズがサンプルに混入していると、バイオアナライザの測定結果に悪影響を与える可能性があります。サンプルへのビーズのコンタミネーションが疑われる場合、サンプルの入ったプレートやチューブを磁石スタンドにセットし、磁性ビーズを吸わないように上澄みを 1 uL 取ってバイオアナライザで分析して下さい。

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 350uL 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.02.02 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 assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。Data コンテキストから、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. ラン終了後、結果をチェックします。以下の泳動図のように、245 bp-325 bp の位置にピークトップを持つ、スミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピーク全体の濃度をバイオアナライザの Region Table 機能を用いて、測定します。断片の分布パターンにはサンプル間で多少の違いが見られることがあります。このスミアピークの濃度をバイオアナライザの Region Table 機能を用いて、測定します。正確な定量のためには、得られた濃度がキットの定量範囲内であることを確認して下さい。

NOTE

gDNA ライブラリのピークトップが 245 bp よりもかなり短い場合、最初の断片化ステップに持ち込む gDNA サンプル量が 50 ng より少なかった可能性があります。逆に DNA ライブラリのピークトップが 325 bp よりもかなり長い場合、最初の gDNA サンプルの量が 50 ng より多かった可能性があります。On Target %の低い Sequencing データとなる可能性があります。

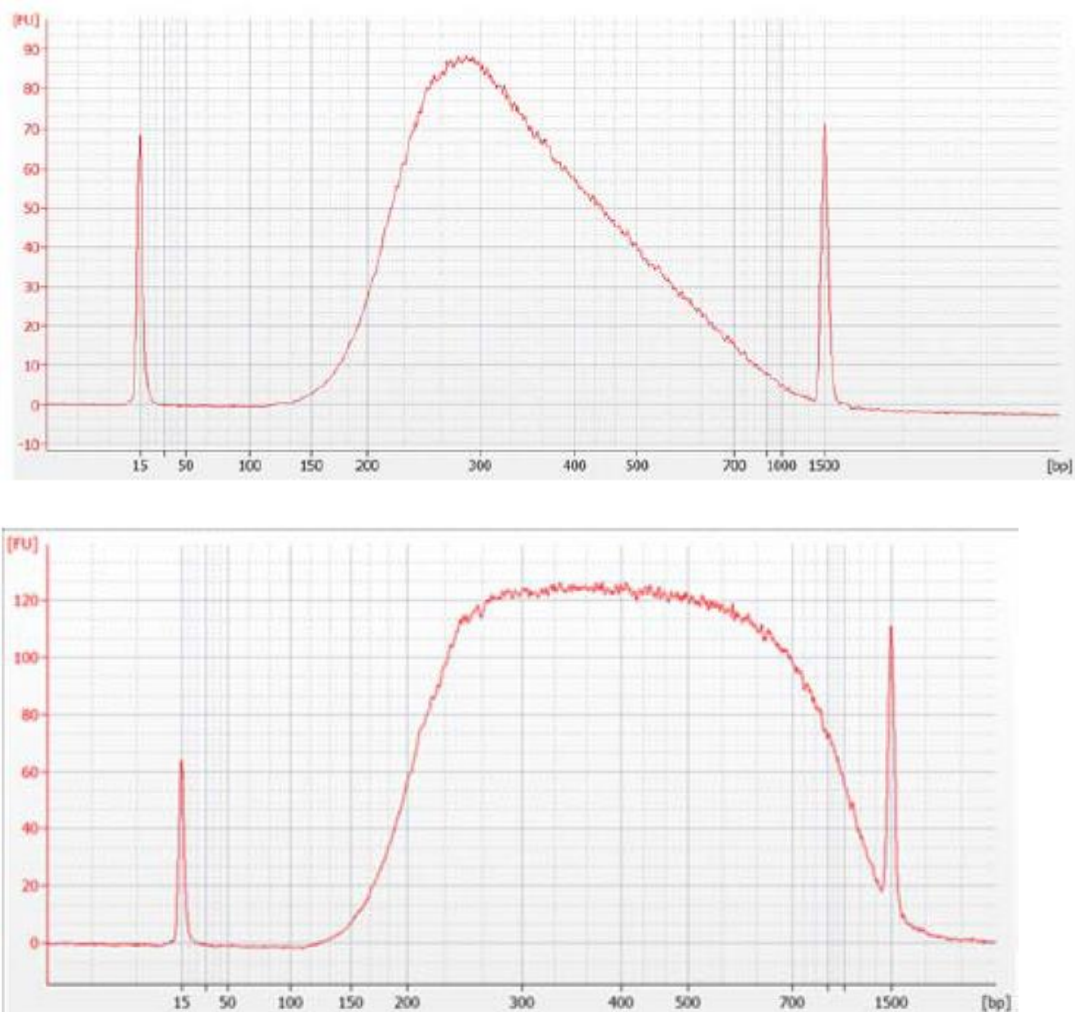


図 2 増幅されたアダプター付き gDNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、この DNA ライブラリはウェルを密封して 4℃で一晩、長期であれば -20℃で保管することができます。

2. サンプルの調製

【4200 / 2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

NOTE

バイオアナライザの代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 試薬キット (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 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。増幅された DNA ライブラリを 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 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 付属ボルテックスミキサでプロトコルに指定の時間、付属のボルテックスをお持ちでない場合最高速度に設定して 10 秒 x2 回、確実に混合して下さい。

2. Agilent 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 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、245 bp から 325 bp 付近の位置に、シングルスミアピークのピークトップがあることを確認します。このスミアピーク全体の濃度を Region Table 機能を用いて、測定します。断片の分布パターンにはサンプル間で多少の違いが見られることがあります。得られた濃度がキットの定量範囲内であることを確認して下さい。

NOTE

gDNA ライブラリのピークトップが 245 bp よりもかなり短い場合、最初の断片化ステップに持ち込む gDNA サンプル量が 50 ng より少なかった可能性があります。逆に DNA ライブラリのピークトップが 325 bp よりもかなり長い場合、最初の gDNA サンプルの量が 50 ng より多かった可能性があります。On Target % の低い Sequencing データとなる可能性があります。

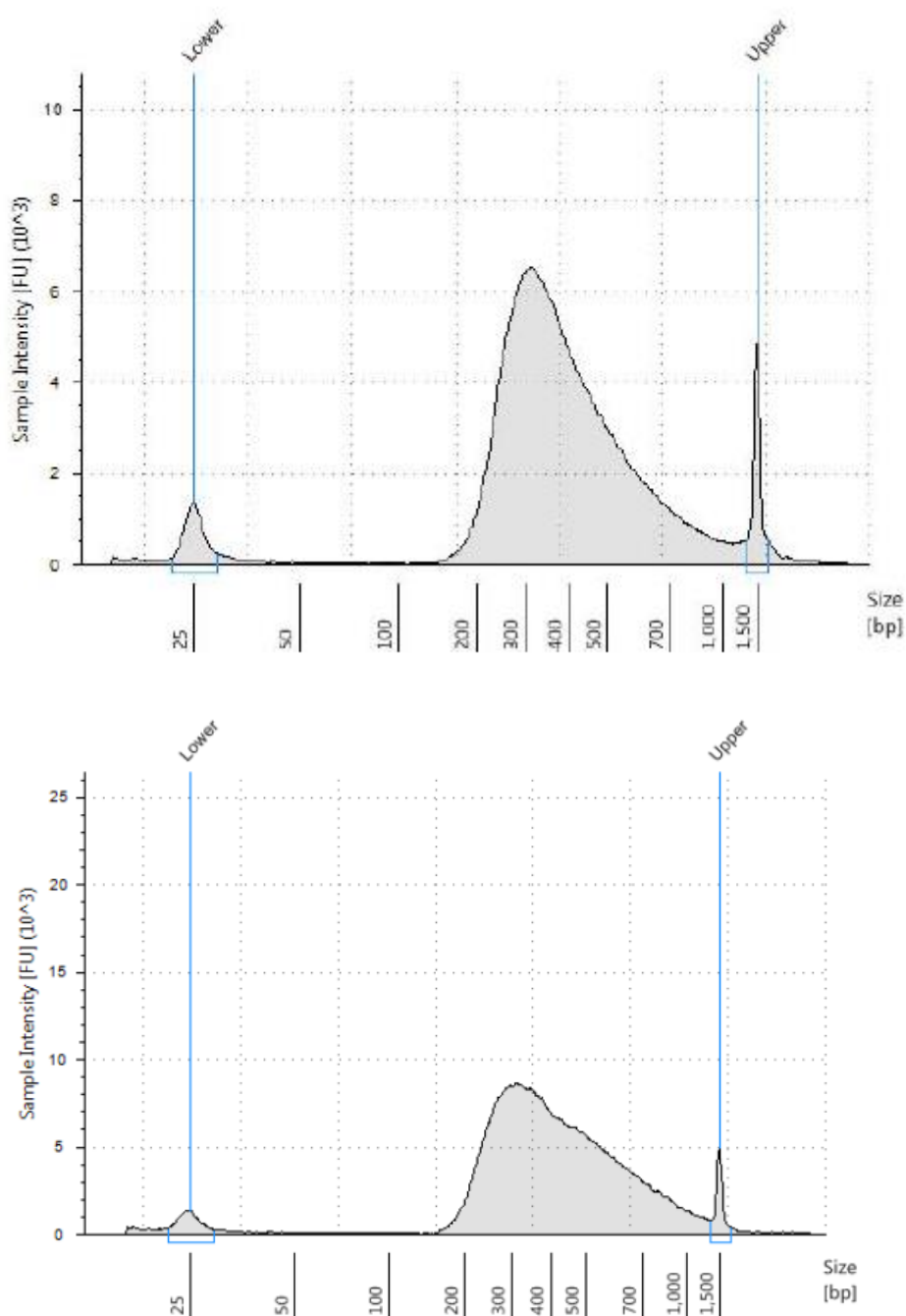


図 3 増幅されたアダプター付き gDNA ライブラリの 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。

Stopping Point 次のステップに進まない場合、この DNA ライブラリはウェルを密封して 4℃で一晩、長期であれば -20℃で保管することができます。



3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

この章では、前章で調製したアダプター付き gDNA ライブラリとアジレント社の SureSelect^{XT} キャプチャライブラリを、ハイブリダイゼーション試薬とブロッキング試薬とともにハイブリダイズします。ハイブリダイゼーションの後、ストレプトアビジンビーズでターゲット分子をキャプチャします。

CAUTION

SureSelect キャプチャライブラリとアダプター付き gDNA 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。

CAUTION

キャプチャのためのハイブリダイゼーションは 1.5 時間行いますが、この間に 30 uL 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 Adhesive seal) の組み合わせで、キャプチャライブラリとアダプター付き gDNA ライブラリを入れない状態で、水 30 uL をハイブリ溶液の代わりに用意し、p.33 に記載の**ハイブリダイゼーションのサーマルサイクラプログラム**を実行し、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 4 uL を超えないようにしてください。

STEP1. ハイブリダイゼーションに用いるアダプター付き gDNA ライブラリの分注

ハイブリダイゼーション反応に用いるアダプター付 gDNA ライブラリの量は、SureSelect^{XT} キャプチャライブラリのサイズによって表 9 のように異なります。

表 9 アダプター付 gDNA ライブラリの量

Capture Library Size	Amount of prepared gDNA library used in hybridization	Volume of prepared gDNA library samples added to hybridization
All Exon Libraries and Custom Libraries >3.0 Mb	750 to 1500 ng DNA	12 µL
Custom Libraries ≤3.0 Mb	500 to 750 ng DNA	12 µL

1. アダプター付き gDNA ライブラリを、以下に示す手順で 96 ウェルプレートもしくは 8 連チューブのハイブリダイゼーションを行うウェルに入れます。前のステップでバイオアナライザもしくは TapeStation の Region Table 機能で得られた濃度を基に、表 9 に示された範囲内で可能な、最大量のアダプター付き gDNA ライブラリを使用するようにします。
 - a. All Exon ライブラリや、キャプチャサイズが 3.0 Mb より大きいカスタムキャプチャライブラリを用いてハイブリダイゼーションを行う際は、各ウェルに最大 1500 ng のアダプター付き gDNA ライブラリを入れ、nuclease-free 水を用いて総量を 12 uL に調整します。
 - b. キャプチャサイズが 3.0 Mb 以下のカスタムキャプチャライブラリを用いてハイブリダイゼーションを行う際は、各ウェルに最大 750 ng のアダプター付き gDNA ライブラリを入れ、nuclease-free 水を用いて総量を 12 uL に調整します。

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

STEP2. アダプター付き gDNA ライブラリと SureSelect キャプチャライブラリのハイブリダイゼーション

このステップでは、表 10 に記載されている SureSelect QXT Reagent キットの試薬を用います。表に記載の条件で、各試薬を融解して下さい。各試薬をボルテックスで混合し、スピンドウンして液をチューブの底に集めます。

表 10 ハイブリダイゼーションとキャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Where Used
SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, -20°C	Warm to Room Temperature (RT), then keep at RT	p. 34
SureSelect QXT Fast Blocker Mix	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, -20	Thaw on ice	p. 32
SureSelect RNase Block	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, -20	Thaw on ice	p. 33
SureSelect ^{XT} Capture Library	-80°C	Thaw on ice	p. 34

CAUTION

チューブのストリップキャップを外す必要があるステップでは、再度キャップをする際には**必ず新しいストリップキャップを使用して下さい**。ストリップキャップを再利用することでサンプルをロスしたり、サンプルのコンタミネーションを招いたり、サーマルサイクラでのインキュベーション中にサンプル温度が不正確になったりする可能性があります。

- 12 uL のアダプター付き gDNA ライブラリを入れた各ウェルに、5 uL の **SureSelect QXT Fast Blocker Mix** を加えます。ピペッティングを 8-10 回行って混合した後、**ウェルを新しいキャップでしっかり密封します**。高速設定のボルテックスで 5 秒間混合した後、スピンドウンします。
サンプルを入れたウェルは現時点で、アダプター付き gDNA ライブラリ + Fast Blocker = 17 uL になります。
- しっかり蓋をしたままの状態、アダプター付き gDNA ライブラリ + Fast Blocker を含んだプレートもしくはチューブをサーマルサイクラに移し、表 11 のプログラムをスタートさせます。Heated Lid は On にします。

重要: 表 11 の Segment 3 に入ったら一旦サーマルサイクラを Pause して下さい。Segment 4 に入る前に、p.35 のステップ 5 でハイブリダイゼーションのウェルに更に試薬を加える必要があります。サーマルサイクラプログラムの Segment 1 と 2 の間に、次のステップ 3 とステップ 4 に記載されている試薬の準備を開始して下さい。これらの試薬の準備の完了が Segment 1 と 2 の間に終わらない場合は、Segment 3 でサーマルサイクラを Pause 状態にした後に試薬の準備を終わらせても構いません。

表 11 ハイブリダイゼーションのサーマルサイクラプログラム *

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	1 minute (PAUSE cyclor here)
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C	Hold [†]

*このサーマルサイクラプログラムをスタートする際、反応ボリュームは 30 uL に設定して下さい (Segment 4 での最終的なハイブリボリュームは 30 uL になります)。

[†] サーマルサイクラが Segment 5 の 65°C Hold のステップに入ったら、p.37 の DNA の回収ステップを開始して下さい。

CAUTION

heated 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注意ください。

- 表 12を参照して **SureSelect RNase Block** の 25 %希釈液(RNase Block 1 : Nuclease-free 水 3) を作製します。一緒に処理するハイブリダイゼーション反応の数+余剰分を調製して下さい。希釈後よく混合し、RNase Block のストックのチューブと希釈後のチューブを氷上に置いて下さい。

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

表 12 RNase Block 希釈液の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)	Volume for 96 reactions (includes excess)
SureSelect RNase Block	0.5 µL	10 µL	50 µL
Nuclease-free water	1.5 µL	30 µL	150 µL
Total	2 µL	40 µL	200 µL

NOTE

次のステップ 4 に記載されている Mix は、表 11 の Segment 3 でサーマルサイクラを Pause にする直前に調製して下さい。この Mix は室温で調製し、ステップ 5 でアダプター付き gDNA ライブラリ + Fast Blocker に加える時点で室温になっていることが重要です。しかしながら、SureSelect キャプチャライブラリを含む溶液は、あまり長時間室温に置くことは望ましくないため、使用する直前に調製します。

4. キャプチャライブラリハイブリダイゼーション Mix を調製します。キャプチャサイズに応じて、表 13 (All Exon、Focused Exome、Clinical Research Exome、Inherited Disease、Kinome、3 Mb 以上のキャプチャサイズのカスタムキャプチャライブラリの場合)、もしくは表 14 (3 Mb 未満のキャプチャサイズのカスタムキャプチャライブラリの場合) を参照して下さい。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリあたり約 1.06 倍の量で計算されています。高速設定のボルテックスミキサーで 5 秒間よく攪拌し、スピンドウンして下さい。その後速やかに次のステップに進んでください。

表 13 キャプチャライブラリハイブリダイゼーション Mix の調製

(All Exon、Focused Exome、Clinical Research Exome、Inherited Disease、Kinome、3 Mb 以上のキャプチャサイズのカスタムキャプチャライブラリの場合)

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 3)	2 µL	34 µL
SureSelect ^{XT} All Exon Library, DNA Kinome Library, or Custom Capture Libraries ≥3 Mb)	5 µL	85 µL
SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer	6 µL	102 µL
Total	13 µL	221 µL

表 14 キャプチャライブラリハイブリダイゼーション Mix の調製
(3 Mb 未満のキャプチャサイズのカスタムキャプチャライブラリの場合)

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 3)	2 µL	34 µL
SureSelect ^{XT} Custom Capture Library <3 Mb	2 µL	34 µL
SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer	6 µL	102 µL
Nuclease-free water	3 µL	51 µL
Total	13 µL	221 µL

- サーマルサイクラが表 11 の Segment 3(65°C1 分)を開始したらすぐ、「Pause」ボタンを押してください。サーマルサイクラを Pause にしたまま、アダプター付き gDNA ライブラリ + Blocker を含んだウェルがサーマルサイクラ中にある状態で蓋を取り、前ステップで調製した室温のキャプチャライブラリハイブリダイゼーション Mix を 13 µL ずつ各ウェルに加えます。
ピペッティングを 8-10 回行い、液をよく混合します。
- ウェルを新しいキャップでしっかり密封します。サーマルサイクラとしてアジレントの SureCycler をお使いの場合は Domed Cap をお使い下さい。各ウェルが確実に密封されていることを確認して下さい。プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラから取り出し、高速設定のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌し、スピンドウンした後プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラに戻します。この操作は、サンプルが完全に室温に冷えてしまわないように、素早く行ってください。
現時点でハイブリダイゼーション反応を行う各ウェルは約 30 µL の溶液を含みます。
- アダプター付き gDNA ライブラリと SureSelect キャプチャライブラリをハイブリダイゼーションさせるため、サーマルサイクラの「Play」ボタンを押し、サーマルサイクリングプログラムを再開して下さい。

CAUTION

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

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

STEP3. DNA ハイブリッドキャプチャのためのストレプトアビジン磁気ビーズの調製

このステップでは、表 15 に記載されている SureSelect QXT Reagent キットの試薬に加えて他社製のストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズを用います(表 1 参照)。

表 15 ハイブリッドキャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	p. 36)
Wash Buffer 2*	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	p. 37
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	p. 37

* このチューブのラベルには SureSelect Wash Buffer 2 または SureSelect QXT Fast Wash Buffer 2 と記載されています。

NOTE

以下のステップでは 1 サンプル分ずつストレプトアビジンビーズを洗浄する方法を記載していますが、より大容量の磁石がある場合、複数サンプル分を 1.5 mL のチューブや 1.5 mL/50 mL のコニカルチューブなどで洗浄することも出来ます。その場合、ロスを考えて余剰分を含めたストレプトアビジンビーズを準備して下さい。最後に洗浄されたビーズを [SureSelect Binding Buffer](#) に再懸濁した後、ハイブリダイゼーションキャプチャに用いるプレートや 8 連チューブのウェルに 200 μ L ずつの洗浄済みビーズを分注することになります。

1. Dynabeads MyOne Streptavidine T1 磁気ビーズをボルテックスで激しく攪拌します。磁気ビーズは保存の間に底に沈んでいます。
2. 1 サンプルあたり 50 μ L の Dynal 磁気ビーズを、新しい 96 ウェルプレートもしくは 8 連チューブの各ウェルに加えます。
3. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 200 μ L の [SureSelect Binding Buffer](#) を加えます。
 - b. 10 回ピペッティングを行い、ビーズを攪拌します。
 - c. ビーズの入ったチューブを専用の磁石にセットします。磁気ビーズ専用の磁石をお使いください。
 - d. 5 分間、もしくは溶液が透明になるまでそのまま静置した後、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 μ L の [SureSelect Binding Buffer](#) に再懸濁します。

STEP4. SureSelect キャプチャライブラリとハイブリダイズした DNA の回収

1. ハイブリダイゼーションステップが完了してサーマルサイクラが 65°C の Hold ステップに達したら、サンプルを室温に置きます。この時、サンプルは若干白濁して見えますが、バッファーの液性によるもので問題ありません。
2. ハイブリダイゼーションサンプルを室温に置いたままマルチチャンネルピペットを用いてウェル内のサンプル全量(約 30 uL)を、洗浄済みストレプトアビジンビーズ 200 uL を含むウェルに移します。ウェルを新しいキャップでしっかり密封します。
3. サンプルの入ったプレートもしくは 8 連チューブを、96 ウェルプレート用 Mixer を用いて 30 分間室温で激しく攪拌します。Mixer として 1,800 rpm で攪拌可能な装置をお使い下さい。IKA 社製の MS3 をお使いの場合、3,000 rpm に設定するとプレートが外れてしまうため、1,800 rpm よりも高速の設定で使わないようにご注意ください。

攪拌の間、ウェル内でサンプルが確実に混ざっていることを確認して下さい。

4. 上記 30 分間の攪拌の間に、[Wash Buffer 2](#) を下記の手順で温めて下さい。
 - a. [Wash Buffer 2](#) を 200 uL、新しいプレートもしくは 8 連チューブの各ウェルに加えます。1 サンプルあたり 3 つのウェルにそれぞれ 200 uL の Wash Buffer を準備します。
 - b. 新しいキャップで各ウェルを密封し、ステップ 10 で使用するまでサーマルサイクラで 65°C に加温します。Heated Lid は On にします。
5. ステップ 3 での 30 分間のインキュベーション終了後、以下のいずれかの方法で溶液をウェルの底に集めます。
 - 8 連チューブの場合はサンプルを軽くスピンドウンして下さい。
 - 96 ウェルプレートの場合は手で素早くさっとプレートを振り下ろし、遠心力で溶液をウェルの底に集めてください。

CAUTION

Wash ステップでは、ストレプトアビジンビーズに結合した DNA サンプルが入った 96 ウェルプレートを、Plate Spinner や遠心分離機を用いてスピンドウンしないで下さい。96 ウェルプレートを遠心するとストレプトアビジンビーズがウェルの底で固まり過ぎて Wash ステップの間に完全に再懸濁することが困難になり、サンプルの回収率に悪影響を与える恐れがあります。

6. チューブを専用磁石にセットして 1 分間静置します。溶液が透明になったら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. ビーズの入ったウェルに、200 uL の [SureSelect Wash Buffer 1](#) を加えてピペッティングを 8-10 回行い、ビーズを再懸濁させます。

次のステップに進む前にビーズが完全に懸濁されていることを確認して下さい。

8. 新しいキャップでウェルを密封し、高速のボルテックスで 8 秒間攪拌します。ステップ 5 と同様の方

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

法で溶液をウェルの底に集めます (8 連チューブの場合スピンドウン、96 ウェルプレートの場合手で振り下ろす)。

9. プレートもしくは 8 連チューブを専用の磁石にセットして、1 分間静置します。溶液が透明になったら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

Wash Buffer 2 が使用前に確実に 65°C に予熱されていることを確認して下さい。

10. プレートもしくは 8 連チューブを磁石から取り出し、室温のスタンドに移します。Wash Buffer 2 を用いて以下の記載に沿って、お使いの SureSelect キャプチャライブラリのキャプチャサイズに応じた手順でビーズを洗浄して下さい。
 - a. 200 μ L の 65°C で余熱済みの Wash Buffer 2 でビーズを再懸濁します。10 回以上ピペッティングを行い、確実にビーズを再懸濁して下さい。
次のステップに進む前にビーズが完全に懸濁されていることを確認して下さい。
 - b. 各ウェルを新しいキャップで密封し、高速のボルテックスで 5 秒間攪拌します。ステップ 5 と同様の方法で溶液をウェルの底に集めます (8 連チューブの場合スピンドウン、96 ウェルプレートの場合手で振り下ろす)。
 - c. プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラ中で 10 分間、65°C で加熱します。Heated Lid は On にします。
 - d. プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラから取り出し、室温で専用磁石にセットします。
 - e. プレートもしくは 8 連チューブを専用の磁石にセットして、1 分間静置します。溶液が透明になったら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。
 - f. ステップ a からステップ e までを計 3 回繰り返し、ビーズを洗浄します。
ステップ 11 にすすみます。

11. 3 回目の Wash で上澄みを除いた後、軽くサンプルをスピンドウンし、プレートもしくは 8 連チューブを専用磁石にセットして Wash Buffer の液滴が残っていれば取り除きます。
12. 23 uL の Nuclease-free 水を各サンプルのウェルに加えます。プレートもしくは 8 連チューブは、p.43 で PCR 反応の準備が完了するまで氷上に置きます。すぐに次のステップに進みます。

NOTE

キャプチャされた DNA ライブラリは、Post-capture PCR による増幅までストレプトアビジンビーズ上に保持されています。この時点ではビーズと上澄みは分けしないで下さい。



4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

この章では、前章で調製したキャプチャ後のライブラリを、増幅する過程で同時にインデックスタグを付けた後、精製し、定量および品質確認を行うステップを説明します。インデックス付加されたサンプルを Multiplex sequencing のためにプールする手順についても説明されています。

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

このステップでは、SureSelect によってキャプチャされた DNA ライブラリを、適切な組み合わせの Dual Indexing プライマーを用いて PCR 増幅します。

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。

このステップでは表 16 に記載されている試薬を使用します。表に記載の試薬を融解した後ボルテックスで攪拌し、氷上に置いて下さい。

表 16 PCR 増幅によるキャプチャ後の Index 付加に用いる試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p. 43
5× Herculase II Reaction Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p. 43
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p. 43
SureSelect QXT P7 and P5 dual indexing primers	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, -20°C	p. 43

1 つのキャプチャ済み DNA ライブラリに対して、1 つのウェルで増幅反応を行います。

1. 各サンプルに付加する適切なインデックスの割り当てを決定します。この DNA ライブラリの増幅ステップで用いる P7・P5 プライマーのインデックス部分の塩基配列については、本書のリファレンスの項に掲載されている表 (HiSeq または MiSeq については表 32、表 33 を、NextSeq 500 については表 32、表 34) を参照してください。

同一レーン上で Sequencing を行うサンプル同士には、異なるインデックスプライマーの組み合わせを使って下さい。

NOTE

シーケンサによる読み取り時のカラーバランスを保つため、サンプルのプールに際しては P7 および P5 プライマーのインデックス部分の塩基の多様性を最大に保つことを推奨します。例えば、8-plex の場合は 8 種類の異なる P7 インデックスプライマーを用い、2 種類の異なる P5 インデックスプライマーを用います。さらに詳細は p.

66

の表 35 と表 36 を参照して下さい。

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

2. 表 17 に従って、サンプル数に応じた PCR 反応液を氷上で調製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリあたり約 1.06 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 17 Post-capture PCR 反応 Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	13.5 µL	229.5 µL
5× Herculanase II Reaction Buffer	10 µL	170 µL
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	0.5 µL	8.5 µL
Herculanase II Fusion DNA Polymerase	1 µL	17 µL
Total	25 µL	425 µL

3. ストレプトアビジンビーズに結合した状態のターゲット濃縮された DNA サンプルが入ったプレートもしくは 8 連チューブを氷上から取り出します。ステップ 2 で調製した 25 µL の PCR 反応 Mix を、各ウェルに入った 23 µL のストレプトアビジンビーズ溶液に加えます。
4. 各 PCR 反応ウェルに、1 µL の適切な **P7 dual indexing プライマー**(96 反応キット:P7 i1 から P7 i12 のいずれか、16 反応キット:P7 i1 から i8 のいずれか)を加えます。各ウェルには、12 種類のプライマーのうち 1 種類だけを加えます。
5. 各 PCR 反応ウェルに、1 µL の適切な **P5 dual indexing プライマー**(96 反応キット:P5 i13 から P5 i20 のいずれか、16 反応キット:P5 i13-i14 のいずれか)を加えます。各ウェルには、8 種類のプライマーのうち 1 種類だけを加えます。
6. ピペッティングでよく混合し、ビーズが完全に懸濁されていることを確認した後、**ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラに移して表 18 の PCR プログラムに従って、増幅を行います。この時点で PCR 終了後の精製に用いる AMPure XP ビーズを、室温に戻しておき、70%エタノールを準備しておくくと便利です。

表 18 PCR プログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	Capture Libraries >3 Mb: 10 Cycles	98°C	30 seconds
	Capture Libraries 1 to 3 Mb: 12 Cycles	58°C	30 seconds
	Capture Libraries <1 Mb: 14 Cycles	72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

7. PCR 増幅プログラムが完了した後、プレートもしくは 8 連チューブを軽くスピンドウンします。専用磁石にセットし、室温でストレプトアビジンビーズを磁石に集めます。2 分間静置して溶液が透明になったら約 50 uL の上澄みを回収し、新しいプレートもしくは 8 連チューブにの各ウェルに取り分けます。ビーズはこの時点で廃棄します。

STEP2. 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℃保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37℃でのインキュベーションに設定しておきます。
2. ステップ 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 uL+余剰分準備します。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 **60 uL** を、前項で増幅した DNA サンプル 50 uL を含んだウェルもしくは 8 連チューブの各ウェルに加えます。**新しいキャップでウェルを密封し**、5 秒間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て液をウェルの底に集めます。この時ビーズを集積させないように注意して下さい。
ビーズ溶液の状態や色がサンプルウェル内で均一であることを確認して下さい。ビーズの層や透明な液体のみの箇所が存在せず、均一な色である必要があります。
5. 室温でサンプルを 5 分間インキュベーションします。
6. ウェルもしくは 8 連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ウェルに 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%エタノールは用時調製して下さい。
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、合計 2 回 Wash します。各 Wash ステップでは確実にエタノールを全て除くように注意して下さい。
11. ウェルもしくは 8 連チューブ 37℃のサーマルサイクラ(蓋を開けた状態)にセットして、1-3 分間 37℃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 3 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、溶出効率が低下する危険性があります。
12. **25 uL** の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. **新しいキャップでウェルを密封し**、ボルテックスミキサでよく攪拌します。その後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. プレートもしくは 8 連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 は溶液の方に移っています。
16. 上澄み液 約 25 uL を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移って

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

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。

STEP3. 電気泳動によるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

精製したキャプチャライブラリの収量とサイズ分布をバイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットもしくは 4200 / 2200 TapeStation を用いて測定します。

【バイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを使う場合】

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 350uL 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、ラダを調製します。

CAUTION

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 uL に 1x TE を数 uL 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 uL 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、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。以下の泳動図のように、325 bp から 450 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。このシングルピークの濃度をバイオアナライザの Region table 機能を用いて、測定します。次の Step にある定量 PCR キットを用いることで、1 レーンに等量のサンプルを混合するために、さらに正確な濃度の決定を行うことができます。

定量 PCR を実施しない場合は p.

52 の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に進んでください。

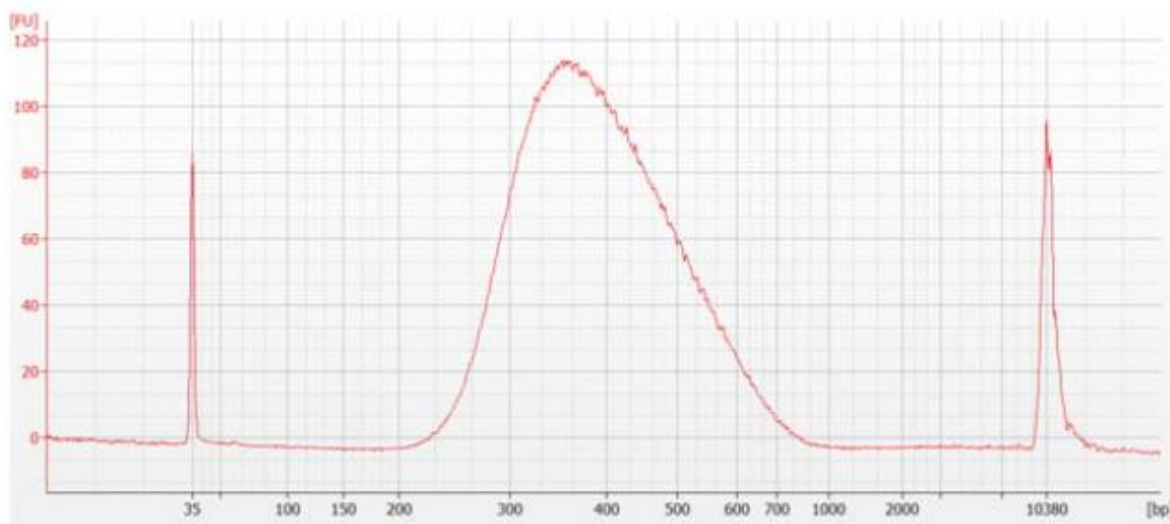


図 4 High Sensitivity DNA キットを用いたキャプチャライブラリの定量とサイズ確認。

Stopping Point 次のステップに進まない場合、このサンプルは 4℃で一晩保存できます。それ以上置く場合は、-20 °℃で保管することができます。

【4200 / 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 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent 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 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 付属ボルテックスミキサでプロトコルに指定の時間、付属のボルテックスをお持ちでない場合最高速度に設定して 10 秒 x2 回、確実に混合してください。

2. Agilent TapeStation User Manual を参照して、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 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、325 bp から 450 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。このシングルピークの濃度を Region table 機能を用いて、測定します。次の Step にある定量 PCR キットを用いることで、1 レーンに等量のサンプルを混合するために、さらに正確な濃度の決定を行うことができます。

High-Sensitivity D1000 の定量範囲は 10 -1000 pg/uL です。これよりも濃度が高い場合には、LowTE で希釈して再度測定してください。

定量 PCR を実施しない場合は p.52 の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に進んでください。

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

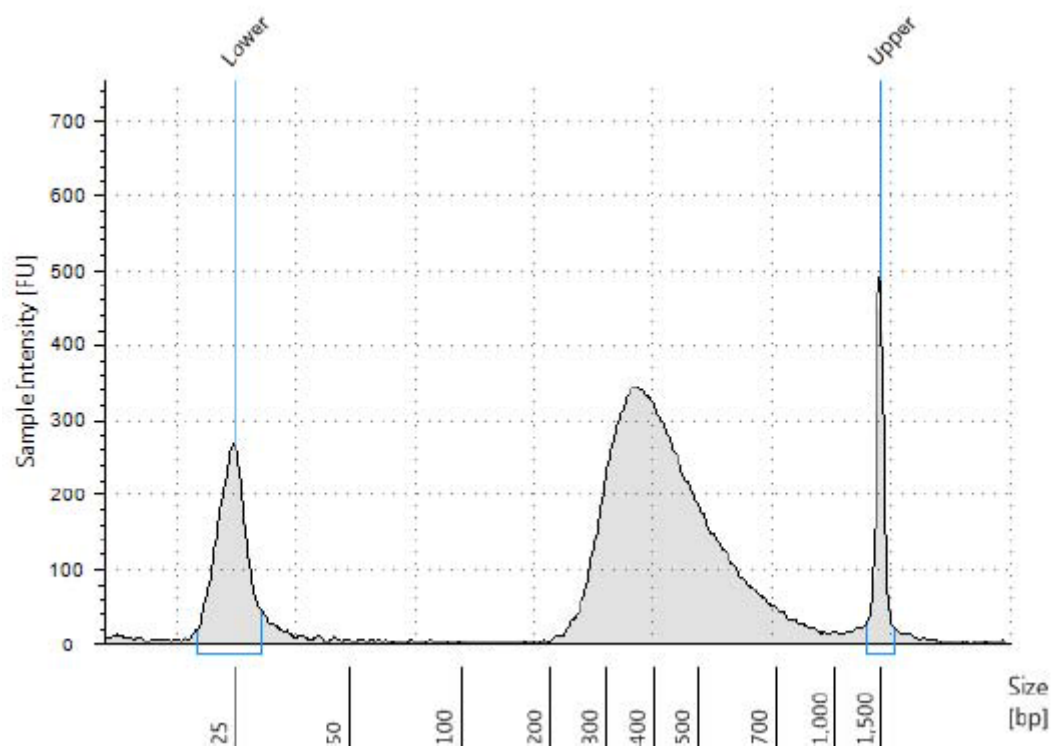


図 5 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation による泳動図。

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 4℃で一晩保存できます。それ以上置く場合は、-20℃で保管することができます。

STEP4. 定量 PCR によるインデックスタグ付きキャプチャライブラリの定量(オプション)

以下のステップの詳細については、Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (p/n G4880A)の protocols を必ず参照ください。

Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (p/n G4880A イルミナ用)を、各インデックスタグ付き DNA ライブラリの定量に用います。

1. G4880A のキット中の試薬を用い、プロトコルを参照して、検量線用の標準液を調製します。
2. 各インデックスタグ付きキャプチャライブラリを、検量線の濃度範囲におさまるように適切な濃度に希釈します。G4880A に含まれる指定の Dilution Buffer を使用するため、必ず G4880A のプロトコルを参照のうえ、調製ください。
一般的にはキャプチャライブラリを、およそ 1:1,000~1:10,000 の比率で希釈することになります。
3. G4880A のプロトコルを参照して、イルミナ Adapter-specific PCR Primers の入った QPCR master mix 溶液を調製します。
4. 各 PCR チューブ(プレート)に、master mix を分注し、template を加えます。
5. Mx3005P などの定量 PCR システムを用いて、G4880A のプロトコルに記載されている定量 PCR のプログラムを設定して RUN します。SYBR Green 対応の機器を使用します。
6. 検量線からそれぞれのインデックスタグ付きキャプチャライブラリの濃度を計算します。濃度は nM で計算します。ここで計算された濃度を元に、マルチプレックスシーケンス用にサンプルを正確に等量でプールします。

STEP5. 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

シーケンサの 1 レーンでプールして解析するインデックス付加したライブラリ数は、使用するシーケンサ装置の出力スペックと、各研究で必要となる目的の Sequencing データ量によって決定します。シーケンサのスペックと、1 サンプルあたり必要になる Sequencing データ量を元に、1 レーンでプールするインデックス付加ライブラリ数を計算して下さい。

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。

SureSelect QXT dual index を用いて Multiplexing を実施する場合の index の最適な組み合わせのガイドラインは表 35 と表 36 をご参照下さい。

1. プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、インデックス付加サンプルをプールするための量を計算します。

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

V(f) : プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f) : プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例: イルミナ標準プロトコルでは 10 nM

: プールするインデックス付加サンプルの数

C(i) : 各インデックス付加サンプルの初期濃度

表 19 に 4 つのインデックスタグ(それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。最終的な容量(この例では 20uL、10nM の濃度)にするには Low TE を用います。

表 19 トータル量 20uL にするためのインデックスタグ付きサンプルの混合例

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

- 最終的に必要な液量になるように調製を行います。
 - プールしたインデックス付加サンプル量の総量が最終的に必要な液量より少ない場合、Low TE Buffer を用いて総量が最終的に必要な液量になるように調整します。
 - プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して最終的に必要な液量とします。
- 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween20 を 0.1%(v/v)の濃度になるように加えて-20°Cで短期間保存できます。

STEP6. クラスタ増幅のためのサンプル調製

SureSelect QXT でターゲット濃縮をしたライブラリの最適な Seeding 濃度は、HiSeq および MiSeq では 8 pM から 12 pM の間、NextSeq 500 では 1.2 pM から 1.4 pM の間です。必要なデータ量とデータの質に応じて決定して下さい。Seeding 濃度とクラスタ密度は、ライブラリの DNA 断片サイズ分布によっても調整する必要がある場合があります。Sequencing 結果の QC のために、イルミナ社の推奨に沿って PhiX コントロールを添加して下さい。

適切なイルミナ社の Paired-End Cluster Generation キットを用いてクラスタ増幅に進んでください。それぞれ 2x100 bp もしくは 2x76 bp と SureSelect QXT の 8 bp dual index の Read に使用可能な試薬キットの構成は表 20 をご覧下さい。**クラスタ増幅のステップは、次ページ「SureSelect QXT Read Primer のイルミナ Paired-End Cluster Generation キットと組み合わせての使用」に記載の変更点を適用し、且つイルミナ社のマニュアルを参照して下さい。**

表 20 イルミナ Cluster Generation キット 選択ガイド

Platform	Run Type	Read Length*	SBS Kit Configuration	Chemistry
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v1 or v2
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	4 × 50 Cycle Kit [†]	v3
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4 × 50 Cycle Kit [†]	v3
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2
MiSeq	All Runs	2 × 76 bp	150 Cycle Kit	v3
NextSeq 500	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2

* 特殊な目的によって上記以外の Read 長が必要な場合、Read 1 と Read 2 に加えて各 8 bp の dual index read (計 16 bp)に十分な量の Sequencing 試薬があることを確認して下さい。

[†] 200 cycle キット 1 つではこのフォーマットで Read 1 と Read 2 に加えて各 8 bp の dual index read (計 16 bp)を実施するのに十分な量の Sequencing 試薬が含まれません。200 cycle キットに加えて 50 cycle キット 1 つを組み合わせることも出来ます。

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

SureSelect^{QXT} Read Primer のイルミナ Paired-End Cluster Generation キットと組み合わせての使用

Illumina シーケンシングプラットフォームで SureSelect QXT ライブラリをシーケンスするには SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2 に含まれる以下の Custom Sequencing Primer を使用する必要があります。

- SureSelect QXT Read Primer 1
- SureSelect QXT Read Primer 2
- SureSelect QXT Index Read Primer
- SureSelect QXT Index 2 Read Primer NSQ (NextSeq プラットフォームのみ)

SureSelect QXT custom sequencing primer は 100 μ M の濃度に調整されており、以下に示す手順に沿って、適切なイルミナ Primer Solution で 1:200 に希釈をする必要があります。

NOTE

各プライマーを示された通りの比率で、正確に組み合わせることが重要です。混合液を調製する際は各試薬チューブのラベルに記載されたボリュームをそのまま採用せず、各溶液を正確に測り取ってご使用下さい。

それぞれの混合液をボルテックスで激しく混合し、custom read primer でインデックス検出が正しく行われるよう、溶液を完全に均一にしてください。

1. HiSeq プラットフォームでは表 21 もしくは表 22 に示す通りプライマーを組み合わせてください。

表 21 HiSeq 2000 と HiSeq 2500 High Output モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect ^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	5 μ L SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	995 μ L HP6 or HP10	1 mL [*] *
Index	15 μ L SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	2985 μ L HP8 or HP12	3 mL
Read 2	15 μ L SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	2985 μ L HP7 or HP11	3 mL

* イルミナの Cluster Generation Protocol の記載に従って、この混合液は HP6 もしくは HP10 として分注して下さい。

表 22 HiSeq 2500 Rapid モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect ^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	8.8 µL SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	1741.2 µL HP10	1.75 mL*
Index	8.8 µL SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	1741.2 µL HP12	1.75 mL
Read 2	8.8 µL SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	1741.2 µL HP11	1.75 mL

* イルミナの Cluster Generation Protocol の記載に従って、この混合液は HP10 として分注して下さい。

2. MiSeq プラットフォームでは表 23 を参照し、以下の手順でプライマーを組み合わせして下さい。

表 23 MiSeq プラットフォームの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect ^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume	Final Cartridge Position
Read 1	3 µl SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	597 µl HP10 (well 12)	0.6 ml	well 18
Index	3 µl SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	597 µl HP12 (well 13)	0.6 ml	well 19
Read 2	3 µl SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	597 µl HP11 (well 14)	0.6 ml	well 20

- イルミナの MiSeq 試薬カートリッジの #12, #13, #14, #18, #19, #20 のウェルに新しい 1000 µL 用ピペットチップで穴をあけます。
- 3 本の新しい 1.5 mL チューブを出し、「Read 1」「Read 2」「Index」と蓋に記入します。
- #12 のウェルから 600 µL の HP10 をピペットで正確に測り取り、「Read 1」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 µL を除き、代わりに 3 µL の [SureSelect QXT Read Primer 1](#) を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンドウンします。
- #13 のウェルから 600 µL の HP12 をピペットで正確に測り取り、「Index」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 µL を除き、代わりに 3 µL の [SureSelect QXT index Read Primer](#) を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンドウンします。
- #14 のウェルから 600 µL の HP11 をピペットで正確に測り取り、「Read 2」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 µL を除き、代わりに 3 µL の [SureSelect QXT Read Primer 2](#) を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンドウンします。
- SureSelect QXT Primer を混合した後の 600 µL の各溶液を、MiSeq 試薬カートリッジの以下のウェルに移します。
 - 「Read 1」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、[SureSelect QXT Read Primer 1](#) を含む Custom Primer Read 1 を #18 へ移す
 - 「Index」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、[SureSelect QXT index Read Primer](#) を含む Custom index Primer を #19 へ移す
 - 「Read 2」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、[SureSelect QXT Read Primer 2](#) を含む Custom Primer Read 2 を #20 へ移す

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

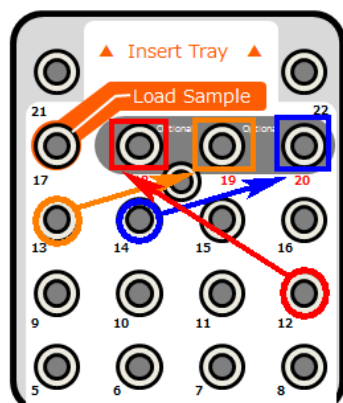


図 12 MiSeq 試薬カートリッジ。各色の丸は溶液を抜き取るウェルを、四角は Custom Sequencing Primer を加えた後に溶液を移すウェルを示します。

g. これ以降の Sample のロードについては、MiSeq の取り扱い説明書をご覧ください。

3. NextSeq 500 プラットフォームでは表 24 に示す通りプライマーを組み合わせてください。

表 24 NextSeq 500 / 550 High-Output v2 Kit での Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect ^{QXT} Primer	Volume of Illumina Primer	Total Volume	Final Cartridge Position
Read 1	3.9 µl SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	1296.1 µl BP10 (from well 20)	1.3 ml	well 7
Read 2	4.2 µl SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	1395.8 µl BP11 (from well 21)	1.4 ml	well 8
Index + Index 2	6 µl SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap) + 6 µl SureSelect QXT Index 2 Read Primer NSQ (purple cap)	1988 µl BP14 (from well 22)	2 ml	well 9

表 25 NextSeq 500 / 550 Mid-Output v2 Kit での Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect ^{QXT} Primer	Volume of Illumina Primer	Total Volume	Final Cartridge Position
Read 1	2.7 µl SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	897.3 µl BP10 (from well 20)	0.9 ml	well 7
Read 2	3.3 µl SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	1096.7 µl BP11 (from well 21)	1.1 ml	well 8
Index + Index 2	4.8 µl SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap) + 4.8 µl SureSelect QXT Index 2 Read Primer NSQ (purple cap)	1590.4 µl BP14 (from well 22)	1.6 ml	well 9

STEP7. Sequencing Run のセットアップと Read からのアダプタートリミング

Custom sequencing primer を使った Sequencing Run のセットアップには、以下の追加ガイドラインと共にイルミナ社の実験プロトコルを参照して下さい。

SureSelect QXTdual index の配列情報は p64 を参照して下さい。

Read を Reference Genome にアラインメントする前に、SureSelect QXT アダプター配列を Read から除去する必要があります。

解析に SureCall を使用する場合 （生物種としてはヒトのみに対応）

HiSeq もしくは MiSeq プラットフォームから出力された Sequencing データからアダプター配列をトリミングする過程は、その後の Read のアラインメント、変異解析とともに、アジレントの NGS データ解析ソフトウェアである SureCall を用いて実施することが出来ます。無償の SureCall ソフトウェアのダウンロードは以下より行うことができます。

[SureCall page at www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)

また本ソフトウェアの和文使い方資料等は以下からダウンロードして頂けます。

SureCall は HiSeq・MiSeq いずれのプラットフォームから出力された FASTQ ファイルでも解析することができます。SureSelect QXT キットを用いて得られたデータを SureCall で解析するにはまず Analysis Workflow を選択する必要があります。選択された Analysis Workflow により、ソフトウェアがライブラリを SureSelect QXT のライブラリであると認識し、自動でアダプタートリミングを実施します。トリミングされた FASTQ ファイルはアラインメントを実施して BAM ファイルを生成するなど、下流の解析に用いられます。

新規の Analysis Workflow を作成するには、p.

59 の

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

REF_Ref390779490 ¥h ¥* MERGEFORMAT 図 13 を

参照して下さい。SureCall を起動し Analysis Workflow タブをクリックして下さい。適切な Analysis Type(single sample/paired analysis/trio analysis)を選択し、**Import Unaligned Files** ボタンをクリックして下さい。Select Unaligned Sample Files ウィンドウ中で **Add** ボタンを使って read 1 と read 2 の FASTQ ファイルを指定して下さい。画面下方の Analysis Method メニューから **Default SureSelect Method** を選択し、Enrichment Method は QXT を選択します。Design メニューから適切な SureSelect デザインを選択し、Platform メニューから **Illumina** を選択します。これ以降のアラインメントや変異解析ステップは、SureCall の説明書をご参照下さい。

アラインメントや下流の解析に他の解析パイプラインを使用する場合、以下のプラットフォームごとのガイドラインを参照して下さい。

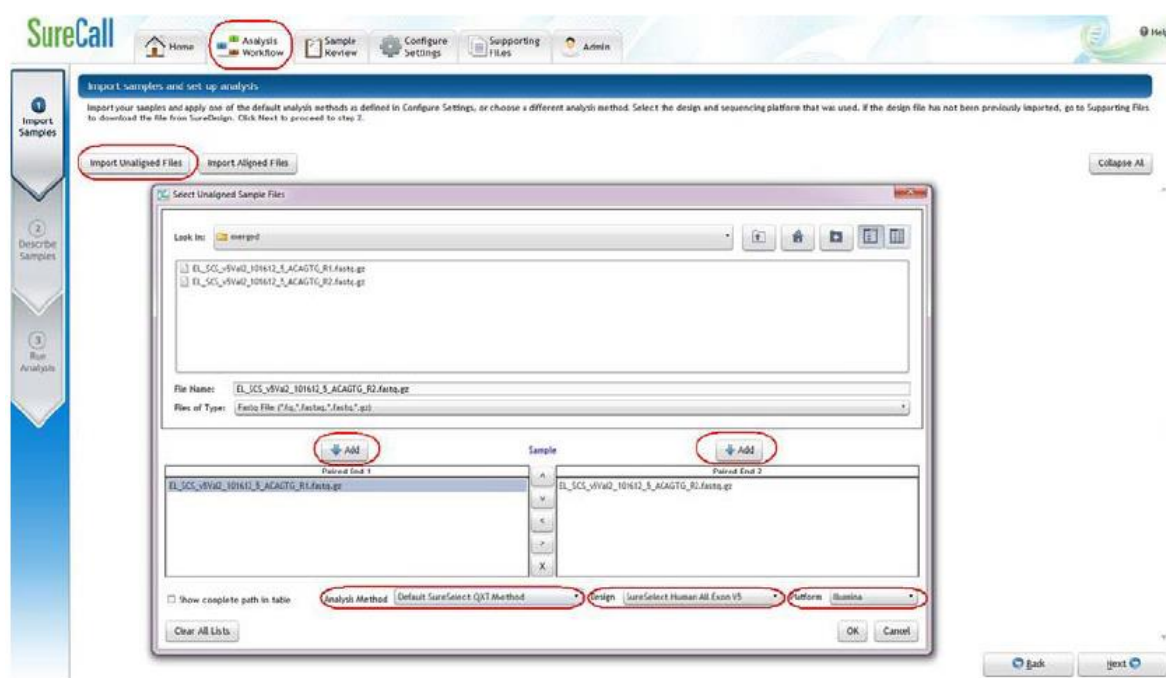


図 13 SureCall の Analysis Workflow の設定

● MiSeq プラットフォーム Sequencing run setup とアダプタートリミングガイドライン

Illumina Experiment Manager(IEM)ソフトウェアを用いて、**custom primer Sample Sheet** を作成して下さい。Read 1, Read 2, Index の Custom Primer にチェックをいれます。

解析に SureCall を使用しない場合、IEM Sample Sheet Wizard を用いて、アダプタートリミングを含む Run の設定を行って下さい。 **Use Adaptor Trimming** にチェックを入れて Wizard を進め、Sample Sheet を出力した後、Excel などを用いて、アダプター配列として **CTGTCTCTTGATCACA** を指定し **SureSelect^{QXT} Target Enrichment System Kit for Illumina Multiplexed Sequencing**

て下さい。これで MiSeq Reporter ソフトウェアがアダプター配列を認識し、Read からアダプタートリミングを実施します。

- **NextSeq 500 プラットフォーム Sequencing run setup とアダプタートリミングガイドライン**

Dual Index 設定を用いて Sequencing Run の設定を行って下さい。また、Custom Primer を使用する設定をして下さい。

Index type selection ボタンから Custom を選択したのち、Run Configuration 画面では表 26 を参照し、サイクル数を設定して下さい。

- **HiSeq プラットフォーム Sequencing run setup とアダプタートリミングガイドライン**

Dual Index 設定を用いて Sequencing Run の設定を行って下さい。QXT Custom Primer は標準的なイルミナの Sequencing primer のチューブに添加されているため、Run の中で Custom Primer を使用するために更なる特別な設定は不要です。

Index type selection ボタンから Custom を選択したのち、Run Configuration 画面では表 26 を参照し、サイクル数を設定して下さい。

表 26 Run Configuration 画面でのサイクル数の設定

Run Segment	Cycle Number
Read 1	100
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	100

Sequencing Run の完了後、CASAVA を用いて demultiplex された FASTQ データを出力します。

解析に SureCall を使用しない場合、AGeNT (アダプタートリミングツール)を用いて Read からアダプター配列トリミングを実施して下さい。このツールは FASTQ 形式のデータを取り込んで Sequencing Read の端からアダプター配列を除去し、トリミング後の FASTQ ファイルを出力します。無償の AGeNT とその説明は、以下からダウンロードできます。

<http://www.genomics.agilent.com/en/NGS-Data-Analysis-Software/AGeNT/?cid=AG-PT-154&tabId=prod2570007>

4. インデックス付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製



5. リファレンス

この章では、キットの構成品、下流のサンプル Sequencing ステップで利用する情報などのリファレンス情報について説明します。

試薬一覧

SureSelect^{QXT} 試薬キットは、以下の構成成品から成ります。各 Box は必ず指定温度で保管してください。

表 27 SureSelect^{QXT} Reagent キット 構成成品一覧

Component Kits	Storage Condition	HiSeq or MiSeq (ILM) 16 Samples	HiSeq or MiSeq (ILM) 96 Samples	NextSeq (NSQ) 16 Samples	NextSeq (NSQ) 96 Samples
SureSelect QXT Library Prep Kit, Box 2*	-20°C	5500-0120	5500-0121	5500-0126	5500-0127
SureSelect QXT Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1	Room Temperature	5190-7333	5190-7335	5190-7333	5190-7335
SureSelect QXT Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 2	-20°C	5190-7332	5190-7334	5190-7332	5190-7334

* SureSelect QXT Library Prep Kit, ILM, Box 1 はこのマニュアルで説明されているワークフローでは使用しません。

表 27 の各構成成品の内容は以下の表に記載されています。

表 28 SureSelect QXT Library Prep ILM, Box 2 の内容

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect QXT Buffer	tube with white cap	bottle
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	tube with orange cap	tube with orange cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap	tube with green cap
DMSO	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect QXT Read Primer 1	tube with amber cap	tube with amber cap
SureSelect QXT Read Primer 2	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect QXT Index Read Primer	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect QXT P7 dual indexing primers	P7 i1 through P7 i8 provided in 8 tubes with yellow caps (one tube per primer)	P7 i1 through P7 i12 provided in 12 tubes with yellow caps (one tube per primer)
SureSelect QXT P5 dual indexing primers	P5 i13 and P5 i14 provided in 2 tubes with blue caps (one tube per primer)	P5 i13 through P5 i20 provided in 8 tubes with blue caps (one tube per primer)

5. リファレンス

表 29 SureSelect QXT Library Prep, NSQ, Box2 の内容

Kit Component	16 Reactions (p/n 5500-0126)	96 Reactions (p/n 5500-0127)
SureSelect QXT Buffer	tube with white cap	bottle
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	tube with orange cap	tube with orange cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
Herculase II 5× Reaction Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap	tube with green cap
DMSO	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect QXT Read Primer 1	tube with amber cap	tube with amber cap
SureSelect QXT Read Primer 2	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect QXT Index Read Primer	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect QXT Index 2 Read Primer NSQ	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect QXT P7 dual indexing primers	P7 i1 through P7 i8 provided in 8 tubes with yellow caps (one tube per primer)	P7 i1 through P7 i12 provided in 12 tubes with yellow caps (one tube per primer)
SureSelect QXT P5 dual indexing primers	P5 i13 and P5 i14 provided in 2 tubes with blue caps (one tube per primer)	P5 i13 through P5 i20 provided in 8 tubes with blue caps (one tube per primer)

表 30 SureSelect QXT Hyb Module Box #1 の内容

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect QXT Stop Solution	bottle	bottle
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2*	bottle	bottle

* このチューブのラベルには SureSelect Wash Buffer 2 または SureSelect QXT Fast Wash Buffer 2 と記載されています。

表 31 SureSelect QXT Hyb Module Box #2 の内容

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect QXT Fast Blocker Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect QXT Primer Mix	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap

SureSelect QXT Dual Index の塩基配列

SureSelect^{QXT} インデックスの塩基配列を次の表に示します。各インデックスは 8 ベースの長さです。8 ベースのインデックスを用いてライブラリの Sequencing を行う方法についてはイルミナの取り扱い説明に従ってください。

表 32 SureSelect^{QXT} P7 index 1 から 12

Index Number	Sequence
P7 Index 1 (P7 i1)	TAAGGCGA
P7 Index 2 (P7 i2)	CGTACTAG
P7 Index 3 (P7 i3)	AGGCAGAA
P7 Index 4 (P7 i4)	TCCTGAGC
P7 Index 5 (P7 i5)	GTAGAGGA
P7 Index 6 (P7 i6)	TAGGCATG
P7 Index 7 (P7 i7)	CTCTCTAC
P7 Index 8 (P7 i8)	CAGAGAGG
P7 Index 9 (P7 i9)	GCTACGCT
P7 Index 10 (P7 i10)	CGAGGCTG
P7 Index 11 (P7 i11)	AAGAGGCA
P7 Index 12 (P7 i12)	GGACTCCT

表 33 SureSelect^{QXT} P5 index 13 から 20。

HiSeq および MiSeq プラットフォーム、または NextSeq プラットフォームを BaseSpace を介してランする場合

Index Number	Sequence
P5 Index 13 (P5 i13)	TAGATCGC
P5 Index 14 (P5 i14)	CTCTCTAT
P5 Index 15 (P5 i15)	TATCCTCT
P5 Index 16 (P5 i16)	AGAGTAGA
P5 Index 17 (P5 i17)	GTAAGGAG
P5 Index 18 (P5 i18)	ACTGCATA
P5 Index 19 (P5 i19)	AAGGAGTA
P5 Index 20 (P5 i20)	CTAAGCCT

5. リファレンス

表 34 SureSelect^{QXT} P5 index 13 から 20、NextSeq プラットフォーム*

Index Number	Sequence
P5 Index 13 (P5 i13)	GCGATCTA
P5 Index 14 (P5 i14)	ATAGAGAG
P5 Index 15 (P5 i15)	AGAGGATA
P5 Index 16 (P5 i16)	TCTACTCT
P5 Index 17 (P5 i17)	CTCCTTAC
P5 Index 18 (P5 i18)	TATGCAGT
P5 Index 19 (P5 i19)	TACTCCTT
P5 Index 20 (P5 i20)	AGGCTTAG

* NextSeq のランを BaseSpace を介して行う場合、表 33 の配列を使用して下さい。

Dual Index 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン

Dual Index を付加したサンプルのプールに関するガイドラインとして、16 反応キットは表 35 に、96 反応キットは表 36 にそれぞれ推奨するインデックスの組み合わせが記載されています。この推奨は、両端の Index Read の際に各サイクルでカラーバランスが保たれるように組み合わせが決定されています。Low-plexity の実験の際には Single index としても Dual Index としても Demultiplexing ができる柔軟性があります。Demultiplexing の際には 1 サンプルあたりに得られる Sequencing 量が最大になるように、1 bp のミスマッチを許容する設定を採用して下さい。

表 35 16 反応キットの Dual Index 付加サンプルのプールに関するガイドライン

Plexity of Sample Pool	Recommended SureSelect ^{OXT} P7 Indexes	Recommended SureSelect ^{OXT} P5 Indexes
1-plex	Any P7 index (i1 to i8)	Either P5 index (i13 or i14)
2-plex	P7 i1 and P7 i2 OR P7 i2 and P7 i4	P5 i13 and P5 i14
3-plex	P7 i1, P7 i2 and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4 and P7 i6 OR P7 i5, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
4- or 5-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i4 and any additional P7 index(es) OR P7 i3, P7 i4, P7 i6 and any additional P7 index(es) OR P7 i5, P7 i7, P7 i8 and any additional P7 index(es)	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
6- to 8-plex	Any combination of 6, 7, or 8 different P7 indexes	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
9- to 16-plex	All eight P7 indexes (i1 to i8)	P5 i13 and P5 i14 (as needed)

5. リファレンス

表 36 96 反応キットの Dual Index 付加サンプルのプールに関するガイドライン

Plexity of Sample Pool	Recommended SureSelect ^{QXT} P7 Indexes	Recommended SureSelect ^{QXT} P5 Indexes
1-plex	Any P7 index i1 to i11	Any P5 index (i13 to i20)
2-plex	P7 i1 and P7 i2 OR P7 i2 and P7 i4	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18
3-plex	P7 i1, P7 i2 and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4 and P7 i6 OR P7 i5, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
4-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i3* and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4, P7 i5* and P7 i6 OR P7 i5, P7 i6*, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
5-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i3*, P7 i4 and P7 i5* OR P7 i3, P7 i4, P7 i5*, P7 i6 and p7 i7* OR P7 i5, P7 i6*, P7 i7, P7 i8 and p7 i9*	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
6- to 11-plex	Any combination of P7 indexes i1 to i11 using each index only once	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
12- to 88-plex	Any combination of P7 indexes i1 to i11 (as needed)	P5 i13 and P5 i14 and any third P5 index OR P5 i15 and P5 i16 and any third P5 index OR P5 i17 and P5 i18 and any third P5 index (as needed)
89- to 96-plex	All twelve P7 indexes (i1 to i12)	Any P5 indexes (i13 to i20, as needed)

* このマークで示されたインデックスは、プールされるほかのサンプルと異なるインデックス配列を持つものであれば、P7 i1 から P7 i11 の中の他のインデックスで置き換えることも可能です。

SureSelect 各プロトコルの違いについてのクイックリファレンス

SureSelect QXT, SureSelect XT, SureSelect XT2 の各プロトコルの違いを以下に示します。

表 37 SureSelect プロトコルの差異

Step/Feature	SureSelect ^{QXT}	SureSelect ^{XT}	SureSelect ^{XT2}
Library Prep			
DNA fragmentation	Transposase-mediated	Mechanical shearing (Covaris)	Mechanical shearing (Covaris)
Library Prep DNA input	50 ng	3 µg or 200 ng	1 µg or 100 ng
Library Prep steps	- Fragmentation and adaptor tagging in single step - PCR	- End repair - dA-tailing - Ligation - PCR	- End repair - Sequential dA-tailing and ligation - PCR
Number of AMPure XP purifications during Library Prep	2	5 (4 for low input protocol)	3
Hybridization/Capture			
Hyb DNA input	750–1500 ng for >3 Mb 500–750 ng for ≤3 Mb	750 ng for all capture sizes	1500 ng total (pools of 8 or 16 indexed samples) for all capture sizes
Indexing	Dual index (post-capture)	Single index (post-capture)	Single index (pre-capture)
Library pooling	Post-capture	Post-capture	Pre-capture (pools of 16 for captures ≤24 Mb or of 8 for exome captures); post-capture pooling optional
Hybridization buffer	1 tube	4 tubes	1 tube
Blocker	1 tube	3 tubes	1 tube
Hybridization mix preparation temperature	Hyb buffer + capture library mixed at RT	Hyb buffer + capture library mixed at RT	Hyb buffer + capture library mixed on ice
Hybridization protocol	Thermal cycling (90 minutes) using 60 cycles of 3 sec @37°C and 60 sec @65°C	Constant temperature (65°C) for 16 or 24 hours	Constant temperature (65°C) for 16 or 24 hours
Step/Feature	SureSelect ^{QXT}	SureSelect ^{XT}	SureSelect ^{XT2}
Streptavidin bead addition conditions	Hybridization mixture transferred to RT and then added to beads	Hybridization mixture held at 65°C while added to beads	Hybridization mixture held at 65°C while added to beads
Number of capture washes	1 × Wash 1 3 × Wash 2	1 × Wash 1 3 × Wash 2	1 × Wash 1 6 × Wash 2

5. リファレンス

Copyright Agilent Technologies 2014

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。

ユーザーの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

本プロトコル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、他の言語に翻訳したり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。