



アジレント SureSelect QXT
ターゲットエンリッチメントシステム
自動化システム対応キット
イルミナペアエンド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 ターゲットエンリッチメント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

Version C1. 対応 [2016年12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。

本日本語プロトコルは、英語版の

Protocol
SureSelect QXT Automated Target Enrichment
for Illumina Multiplexed Sequencing
Version C0., November 2015
G9681-90010

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 Agilent の SureSelect QXT 自動化対応キットを用い、ゲノムの中のターゲット領域を Capture 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(Bait)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。サンプル調製ステップは NGS 自動化システムで多くの部分が自動化されています。

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 QXT ターゲットエンリッチメントシステム自動化対応キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。自動化用ではない SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントシステムライブラリ調製キットを使用する場合、別途、専用プロトコルを参照ください。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

### 安全性に関する警告表示

# CAUTION

CAUTION 通知は、正しく実行されないか、注意事項が遵守されない場合、製品の損害または重要なデータの損失につながる危険性を警告しています。示された条件を完全に理解し、その条件が満たされるまでは CAUTION 通知の次のステップには進まないでください。

# WARNING

WARNING 通知は、正しく実行されないか、注意事項が遵守されない場合、怪我や死亡事故につながる危険性を警告しています。示された条件を完全に理解し、その条件が満たされるまでは WARNING 通知の次のステップには進まないでください。

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. SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントシステムのための Agilent NGS 自動化システムの使用

この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムプロトコルの概要、および SureSelect の実験をデザインする際の Agilent NGS 自動化システムを使った自動化プロセスで注意すべきポイントについて説明しています。

#### 3. サンプル調製

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 もしくは ClearSeq キャプチャライブラリを用いて、前章で準備した DNA ライブラリをハイブリダイズし、ターゲット領域を濃縮するステップについて説明しています。

## 5. Index 付加と Multiplexing Sequencing のためのサンプル調製

この章では、ターゲット領域濃縮後のサンプルの増幅、精製と品質チェックのステップについて 説明しています。Multiplexing Sequencing を行うサンプルの調製方法のガイドラインを掲載し ています。

#### 6. リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬や消耗品の付加的な注意点と、Index 配列について説明しています。

#### Version C0 での変更点

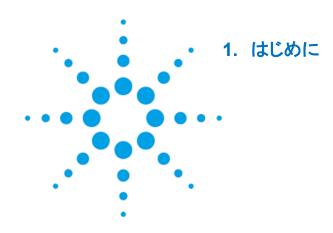
- NextSeq 500 v2 プラットフォームで使用するカスタムシークエンス用プライマーミックス溶液の内容を更新しました(p.115 表 63、表 64をご参照ください)。
- BaseSpace を利用して NextSeq 500 v2 プラットフォームでのランを実施する際の P5 Index 配列情報を更新しました(p.124 表 72 をご参照ください)。
- Qubit dsDNA Assay Kit の製品名を更新しました(p.12 表 1、p.38 ステップ 4 をご参照ください)。
- SureCycler 8800 PCR プレートの互換性に関する情報を更新しました (p.34 Caution 欄をご参照ください)。
- Agilent 4200 TapeStation をご利用いただく場合の情報もサポートされています(p.15 表 5 をご参照ください)。
- Axygen 社 96 Deep Well プレートの型番情報を改訂しました(p.15 表 5をご参照ください)。
- NucleoClean decontamination スプレー溶液の型番情報を改訂しました (p.15 表 5 をご参照ください)。

#### Version B1 での変更点

- ClearSeq Comprehensive Cancer ライブラリを含む ClearSeq キャプチャライブラリの情報をサポートしています(p.14 表 3 をご参照ください)。
- Human All Exon v6 キャプチャライブラリの情報をサポートしています (p.13 表 2をご参照ください)。
- HiSeq 2500 ラピッドランモードでシークエンスする際に使用する SBS キットの構成品の詳細を更新しました(p.112 表 59 をご参照ください)。
- NextSeq 500 v2 を使用したシークエンスをサポートしています(p.115 表 63 をご参照ください)。
- Qubit dsDNA Assay キットの型番情報を改訂しました(p.12 表 1をご参照ください)。

# 目次

1. はしめ		8
操作に関	する注意	8
	, する注意	
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
オプション	/試薬	14
実験に必	要な装置、消耗品類	15
2. Agiler	nt NGS 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment	17
Agilent S	ureSelectXT 自動化システムについて	18
	ect Target Enrichment Procedure の概要	
	ンを行う上での実験条件の検討	
3. サンプ	ルの調製	37
STEP1	DNA サンプルと試薬の準備	38
STEP2	Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加	40
STEP3	アダプター付き gDNA ライブラリの増幅	47
STEP4	AMPure XP ビーズによるアダプター付き gDNA ライブラリの精製	55
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	59
4. ハイブ	リダイゼーション	63
STEP1	ハイブりダイゼーションを行うアダプター付き gDNA サンプルの準備	64
STEP2	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	
STEP3	ハイブリダイズされた DNA のキャプチャ	82
5. マルチ	プレックスシーケンスのための Index 付加とサンプル準備	91
STEP1	キャプチャライブラリの増幅と Index タグの付加	
STEP2	AMPure XPビーズを用いた Index 付加ライブラリの精製精製	102
STEP3	Index を付加した DNA サンプルの品質評価	
STEP4	定量 PCR による Index タグ付きキャプチャライブラリの定量(オプション)	
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	
STEP6	シーケンスサンプルの準備	111
STEP7	Sequencing ランのセットアップと Read からのアダプタートリミング	116
6. リファレ	ルス	119
試薬一覧		120
SureSele	ect QXT Dual Index の塩基配列	123
Dual Inde	ex 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン	125



操作に関する注意	8
安全に関する注意	11
実験に必要な試薬	12
オプション試薬	14
実験に必要な装置、消耗品類	15

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

## NOTE

本プロトコルは Agilent NGS 自動化システムを用いたサンプル自動調製について説明します。 Agilent の SureSelect QXT Target Enrichment Kit(イルミナマルチプレックスシーケンシグ対応)を用いてマニュアルでサンプルを調製する場合には別途、専用プロトコル(G の和訳版)を参照ください。

#### NOTE

本製品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

本 SureSelect QXT 自動化システム対応キットにつきましては、他のマニュアル操作の製品と同様に、誤った使用法による実験の失敗については、補償の対象外となりますことをご了承ください。万一、自動化システムもしくは弊社試薬の不具合により、実験がうまくいかなかった場合は、弊社サポート担当にご連絡ください。連絡先はプロトコル末尾に記載されています。

#### NOTE

本プロトコルは、イルミナ社のマルチプレックスペアエンドサイブラリ作製プロトコルと 異なる点がありますのでご注意ください。

## NOTE

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

#### NOTE

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

#### 操作に関する注意

#### ≪重要≫

● Agilent SureSelect QXT システムで最適なパフォーマンスを実現するためには、高品質の DNA サ

- ンプルが必要です。Workflowを始める前に、DNA サンプルの品質を確認してください。DNA の損傷を防ぐため、希釈した DNA 溶液は 4°Cで保存し、凍結融解を繰り返さないようにしてください。
- SureSelect QXT ライブラリの調製は、DNA サンプルやキット構成品の反応溶液の量の変動にとて も影響を受けやすいため、DNA サンプルは p.38 に記載の方法で希釈、定量することが重要です。 すべての反応溶液は慎重に定量し、本プロトコルに記載されたとおりに混合してください。溶液の正 確な定量を行うために、定期的なピペットのキャリブレーションを行ってください。
- SureSelect QXT Enzyme Mix の取扱いに注意してください。-20°C で保存していたバイアルを使用する際は、氷上もしくは冷却ブロックに置き、使用後は-20°Cで保存してください。
- 遠心の際にシールを貼ったプレートについては、特にシールを貼ったままという記載のない限り、 Bravo やミニハブのデッキにプレートを載せる際に、シールを必ずはがしてください。シールをはがす 時に、反動で液がはねないようにご注意ください。
- このプロトコルの特定の段階では、Bravo デッキとサーマルサイクラの間で、実験者がサンプルプレートを素早く移動させる必要があります。ご使用になるサーマルサイクラを Agilent NGS 自動化システムのごく近くに置き、迅速かつ効率的なプレートの移動ができるようにしてください。
- 各自動化プロトコルのランを始める前にそのステップに詳述されているように Agilent NGS 自動化システムを準備してください。ワークステーションの Labware MiniHub にプレートをセットする際には、いつも 21 ページの図 2 の向き (A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる) でプレートを置いてください。
- Thermo Scientific Reservoir を MiniHub にセットする際は、かならず、切り欠きの部分が MiniHub の中心側を向くように置いてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けないようにしてください。
- 黒アダプターに ABI MicroAmp プレートをセットする場合やシルバーの Nunc DeepWell プレートイン サートに Nunc DeepWell プレートをセットする場合に、プレートが浮きやすくなります。手でそっと押 し下げて確実にセットするようにしてください。
- ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリーエアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用ください。
- 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、基本的には 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。ただしプロトコルで Vortex による混合が指定されている個所は、プロトコルにしたがってください。
- 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。本プロコトルに示されている stopping point では、gDNA サンプルを 4°C で一晩保存できます。24 時間以上保存する場合にはサンプルは-20°C で保存してください。ただし、サンプルの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。

● 本バージョンから、アジレントサービス担当者向けの機能として、据え付け時のソフトウェアの動作確認のため、インキュベーションとミックスの時間をスキップして、プログラムを走らせる機能が付加されました。Form 画面の一番右下に次の画面があります。

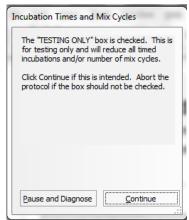


この設定に誤ってチェックを入れると、正

常なインキュベーションとミックスが行われません。

誤ってチェックを入れたままプログラムをスタートすると、次のメッセージが画面に現れます。

このメッセージが画面に現れたら、プログラムが正常動作しませんので、Pause and Diagnosis のボタンをクリックしてください。続けて以下の Schedule Paused のポップアップ画面が出ますので、ここで Abort Process をクリックし、Protocol を Abort で止めてから、Advanced Setting の



TESTING ONLY のチェックを外して、再度ランさせてください。

● 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。

# 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 SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントに必要な試薬

Description	Vendor and part number		
SureSelect or ClearSeq Capture Library	Select one library from Table 2 or Table 3		
SureSelect <sup>QXT</sup> Reagent Kit	Agilent		
Illumina HiSeq or MiSeq platform (ILM), 96 Samples	p/n G9681B		
Illumina NextSeq platform (NSQ), 96 Samples	p/n G9683B		
Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter Genomics		
5 ml	p/n A63880		
60 ml	p/n A63881		
450 ml	p/n A63882		
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific		
2 ml	p/n 65601		
10 ml	p/n 65602		
100 ml	p/n 65603		
1X Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific p/n		
	12090-015, or equivalent		
100% Ethanol, molecular biology grade	Sigma-Aldrich p/n E7023		
Qubit dsDNA HS Assay Kit or	Thermo Fisher Scientific p/n Q32851		
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific		
100 assays	p/n Q32850		
500 assays	p/n Q32853		
Nuclease-free Water (not DEPC-treated)	Ambion Cat #AM9930		

# 表 2 SureSelect<sup>XT</sup> 自動化キャプチャライブラリ

Capture Library	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect <sup>XT</sup> Clinical Research Exome V2	5190-9493	_
SureSelect <sup>XT</sup> Clinical Research Exome V2 Plus 1	5190-9496	-
SureSelect <sup>XT</sup> Clinical Research Exome V2 Plus 2	5190-9499	_
SureSelect <sup>XT</sup> Clinical Research Exome	5190-7344	_
SureSelect <sup>XT</sup> Focused Exome	5190-7789	_
SureSelect <sup>XT</sup> Focused Exome Plus 1	5190-7792	_
SureSelect <sup>XT</sup> Focused Exome Plus 2	5190-7796	_
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v6	5190-8865	_
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v6 + UTRs	5190-8883	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v6 + COSMIC	5190-9309	_
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v6 Plus 1	5190-8868	_
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v6 Plus 2	5190-8871	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v5	5190-6210	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v5 + UTRs	5190-6215	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v5 + IncRNA	5190-6448	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v5 Plus	5190-6224	-
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v4	5190-4633	5190-4635
SureSelect <sup>XT</sup> Human All Exon v4 + UTRs	5190-4638	5190-4640
SureSelect <sup>XT</sup> Mouse All Exon	5190-4643	5190-4645
SureSelect <sup>XT</sup> Custom 1 kb up to 499 kb (reorder)	5190-4808 (5190-4813)	5190-4810 (5190-4815)
SureSelect <sup>XT</sup> Custom 0.5 Mb up to 2.9 Mb (reorder)	5190-4818 (5190-4823)	5190-4820 (5190-4825)
SureSelect <sup>XT</sup> Custom 3 Mb up to 5.9 Mb (reorder)	5190-4828 (5190-4833)	5190-4830 (5190-4835)
SureSelect <sup>XT</sup> Custom 6 Mb up to 11.9 Mb (reorder)	5190-4838 (5190-4843)	5190-4840 (5190-4845)
SureSelect <sup>XT</sup> Custom 12 Mb up to 24 Mb (reorder)	5190-4898 (5190-4903)	5190-4900 (5190-4905)

# 表 3 ClearSeq 自動化キャプチャライブラリ

96 Reactions	480 Reactions	
5190-8013	5 × 5190-8013	
5190-8016	5 × 5190-8016	
5190-7520	5 × 5190-7520	
5190-7523	5 × 5190-7523	
5190-4648	5190-4650	
	5190-8013 5190-8016 5190-7520 5190-7523	

# オプション試薬

### 表 4 SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントのオプション試薬

Description	Vendor and part number
Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (Illumina GA)	Agilent p/n G4880A

# 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 5 SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントに必要な装置、消耗品類

Description	Vendor and part number		
Agilent NGS Workstation Option B, with VWorks software version 13.0.0.1360 or 11.3.0.1195	Agilent p/n G5522A  Contact Agilent Automation Solutions for more information:  Customerservice.automation@agilent.com		
Robotic Pipetting Tips (Sterile, Filtered, 250 µL)	Agilent p/n 19477-022		
Clear Peelable Seal plate seals (for use with the PlateLoc Thermal Plate Sealer)	Agilent p/n 16985-001		
Thermal cycler and accessories	SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent p/n G8810A), 96 well plate module (Agilent p/n G8810A) and compression mats (Agilent p/n 410187) or equivalent		
PCR plates compatible with selected Thermal Cycler, e.g. Agilent semi-skirted PCR plate for the SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent p/n 401334		
When selecting plates for another thermal cycler, see Table 9 on page 35 for the list of PCR plates supported in automation protocols			
Eppendorf twin.tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf p/n 951020401 or 951020619		
Thermo Scientific Reservoirs	Thermo Scientific p/n 1064156		
Nunc DeepWell Plates, sterile, 1.3-ml well volume	Thermo Scientific p/n 260251		
Axygen 96 Deep Well Plate, 2 mL, Square Well (waste reservoirs; working volume 2.2 mL)	Axygen p/n P-2ML-SQ-C E & K Scientific p/n EK-2440		
DNA LoBind Tubes, 1.5-ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf p/n 022431021 or equivalent		
Nucleic acid surface decontamination wipes	DNA Away Surface Decontaminant Wipes, Thermo Scientific p/n 7008, or equivalent		
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific p/n Q32857		
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific p/n Q32856		
Vacuum concentrator	Savant SpeedVac, model DNA120, with 96-well plate rotor, model RD2MP, or equivalent		

表 5 SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントに必要な装置、消耗品類

Description	Vendor and part number		
Magnetic separator	DynaMag-50 magnet, Life Technologies p/n 123-02D or equivalent		
DNA Analysis Platform and Consumables			
Agilent 2100 Bioanalyzer Laptop Bundle	Agilent p/n G2943CA		
Agilent 2100 Bioanalyzer Electrophoresis Set	Agilent p/n G2947CA		
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent p/n 5067-1504		
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent p/n 5067-4626		
OR			
Agilent 4200 TapeStation	Agilent p/n G2991AA		
Agilent D1000 ScreenTape	Agilent p/n 5067-5582		
Agilent D1000 Reagents	Agilent p/n 5067-5583		
Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent p/n 5067-5584		
Agilent D1000 Reagents	Agilent p/n 5067-5585		
OR			
Agilent 2200 TapeStation	Agilent p/n G2964AA or G2965AA		
Agilent D1000 ScreenTape	Agilent p/n 5067-5582		
Agilent D1000 Reagents	Agilent p/n 5067-5583		
Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent p/n 5067-5584		
Agilent D1000 Reagents	Agilent p/n 5067-5585		
Centrifuge	Eppendorf Centrifuge model 5804 or equivalent		
Plate or strip tube centrifuge	Labnet International MPS1000 Mini Plate Spinner p/n C1000 (requires adapter, p/n C1000-ADAPT, for use with strip tubes) or equivalent		
Pipettes (multichannel pipette and P10, P20, P200 and P1000 pipettes)	Pipetman or equivalent		
Vortex mixer			
lce bucket			
Powder-free gloves			
Sterile, nuclease-free aerosol barrier pipette tips			



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

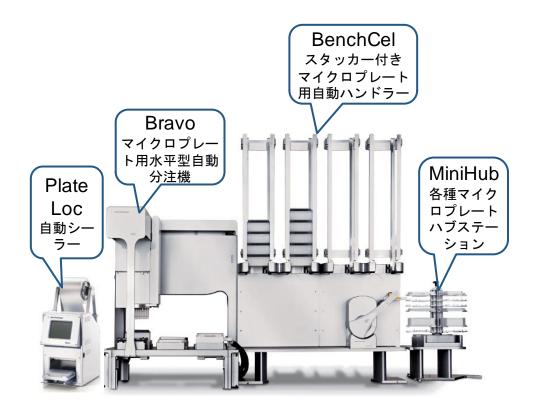
Agilent SureSelectXT 自動化システムについて	18
SureSelect Target Enrichment Procedure の概要	31
自動化ランを行う上での実験条件の検討	34

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

#### Agilent NGS 自動化システムについて

#### Agilent NGS 自動化システム

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



#### Bravo プラットフォームについて

Bravo プラットフォームは、96 ウェル、384 ウェルのプレートのハンドリングに適した 9 つのプラットフォームデッキがある多目的自動分注機です。Bravo プラットフォームは VWorks Automation Control ソフトウェアでコントロールします。交換可能な 7 種類の固定チップまたは使い捨てチップ用ピペットヘッドが選択でき、0.1 µL から 250 µL までの液体を正確に分注できます。

## CAUTION

はじめに、ご使用の Bravo プラットフォームの操作、メンテナンス、および安全上の注意をよくお読みください。 Bravo Platform User Guide (G5409-90004) および VWorks Software User Guide (G5415-90002) を参照してください。

#### Bravo プラットフォームデッキ

このプロトコルの以下のセクションでは、Bravo デッキの指定の場所にプレートや試薬リザーバーを設置するための説明があります。Bravo プラットフォームデッキの番号については、図 1を参照してください。正しく自動化システムを使用するために、このデッキの位置情報は非常に重要です。



図1 Bravo プラットフォームデッキ

#### BenchCel について

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

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

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

#### Bravo デッキヒートブロックの温度設定

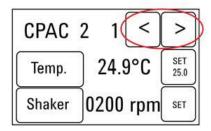
Bravo デッキ 4 番と 6 番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプルプレートをインキュベートするために使用しています。高温(85°C)または低温(4°C)でのインキュベーションステップを含むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておくと、操作時間を短縮できます。

Bravo デッキヒートブロックの温度は、以下に説明する手順で、Inheco Multi TEC Control 装置で変更することができます。Bravo のヒートブロック付きデッキの番号は、Inheco Multi TEC Control 装置で P.20 の表 6 のように示されます。

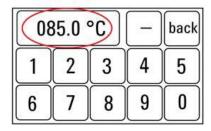
表 6 Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示

Bravo デッキの位置	Inheco Multi TEC Control Screen の表示
4	CPAC 2 1
6	CPAC 2 2

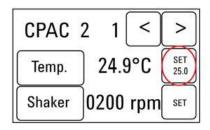
1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置(CPAC 2 1 または CPAC 2 2)を選択します。



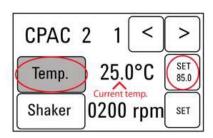
2. 選択したデッキ位置のヒートブロックの温度を設定するには、SET ボタンを押します。



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



4. Temp ボタンを押して、新しく設定した温度が SET ボタンに表示されることを確認してください。 Temp ボタンを押すと、Temp.ボタンの色が暗くなり、選択したヒートブロックが新しく設定した温度に なるように加熱または冷却されます。このボタンを押さないと、実際に入力した温度にコントロールされないので、ご注意ください。



#### チラーの温度設定

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

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



#### MiniHub について

MiniHub にプレートをセットする際には、いつも図 2 の向き(A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる)でプレートを置いてください。Thermo Scientific Reservoir を MiniHub にセットする際は、かならず、切り欠きの部分が MiniHub の中心側を向くように置いてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けないようにしてください。

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

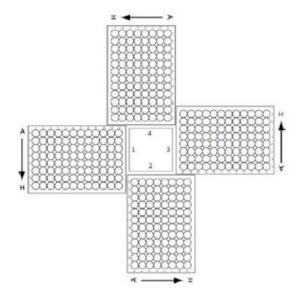


図 2 Agilent Labware Minihub プレート配置図

#### [MiniHub のイニシャライズボタン追加]

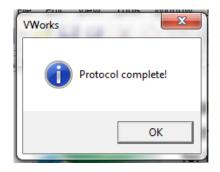
MiniHub の横や後ろにスペースがなく、MiniHub にプレートをセットしにくい場合、MiniHub の電源をい

ったん OFF にして、手動で MiniHub を回転させて必要なプレートをセットし、セットが終わった後に MiniHub の電源を再び ON にして、Initilize MiniHub ボタンを押してイニシャライズをかけることができる ようになりました。



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

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



OK ボタンを押してから、次の操作を行ってください。

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

#### PlateLoc について

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

#### 電源オン

エアコンプレッサー、Bravo, BenchCel, MiniHub, PlateLoc, Inheco ヒートブロックの電源を入れます。チラーはプロトコルを参照し、チラー電源をオンにすると指示されているプロトコルでのみ、電源を入れるようにします。エアコンプレッサーは電源を入れる前に、排気口をクローズの状態にしていることを確認してください。Bravo の電源は本体右側面に、BenchCel の電源は、本体右背面に、MiniHub の電源は、MiniHub が接続されている電源ボックスの正面にあります。Inheco ヒートブロックの電源は背面に、チラーの電源は左側面にあります。PlateLoc は背面の Air スイッチが ON であることを確認します。最後にPC の電源を入れ、VWorks ソフトウェアを起動します。

#### 電源オフ

VWorks ソフトウェアをクローズします。メソッドは変更したり、上書き保存しないようにしてください。その後、Bravo, BenchCel, MiniHub, PlateLoc, Inheco ヒートブロック、チラーの電源を落としていきます。BenchCel の電源を落とす時には、ハンドラーの下部に指を挟まないように注意してください。エアコンプレッサーは電源を落とした後に、排気口を開けて、排気してください。その際、あまり勢いよく排気口を Open すると、高い圧力で空気と水が飛び出すことがあるので、ご注意ください。動作中に内部にたまった水も同時に排出されますので、排気口にキムタオルなどを置いて水が床に垂れないようにご注意ください。

PlateLoc は電源を単純にオフすると、プレートを載せるデッキが外に出た状態のままになります。デッキが出ている状態が気にならない場合は、そのままでもかまいませんが、プレートを内部にしまいたい場合は、エアコンプレッサーの電源をオフにした後、PlateLoc の背面の Air スイッチを OFF にしてください。デッキを手で、内部に押しこむことができます。次に使用するときには、PlateLoc の背面の Air スイッチを必ず ON にしてください。

#### VWorks Automation Control ソフトウェア

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

NOTE

このマニュアルは、VWorks software version 11.3.0.1195 に対応しています。
VWorks のバージョンについてのご質問は、email\_japan@agilent.com までご連絡ください。

#### VWorks ソフトウェアへのログイン

- 1. Windows のデスクトップにある VWorks アイコン、または SureSelect\_XT\_Illumina.VWForm ショートカットをダブルクリックして VWorks ソフトウェアを起動してください。
- 2. User Authentication ダイアログボックスが現れない場合には、VWorks ウィンドウのツールバーの Log in をクリックしてください。
- 3. User Authentication ダイアログボックスでは、VWorks ユーザー名とパスワードを入力し、**OK** を クリックしてください。(ユーザーアカウントがない場合には、管理者に問い合わせてください。)



#### VWorks ソフトウェアでの User Authentication の設定(Administrator 権限ユーザーのみ可能)

- 1. VWorks ソフトウェアの画面で Full Screen を off にしてください。
- 2. 画面上部のメニューバーから Tools をクリックし、その下の User Management をクリックしてください。
- 3. Create New User を選択します。 この画面で、適切な User Name と Password を設定してください。また適切な Security Level を設定ください。Administrator レベルおよび Technician レベルは、メソッドの書き換えが可能なので、Administrator 権限者以外の使用はお勧めしません。通常はメソッドの書き換えができない Operator レベルでの設定を推奨します。ただし、アクセスできる機能は制限されます。
- 4. Pass word の適切な有効期間など他の項目を設定し、VWorks の画面に戻ります。

## VWorks プロトコルとランセットファイル

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

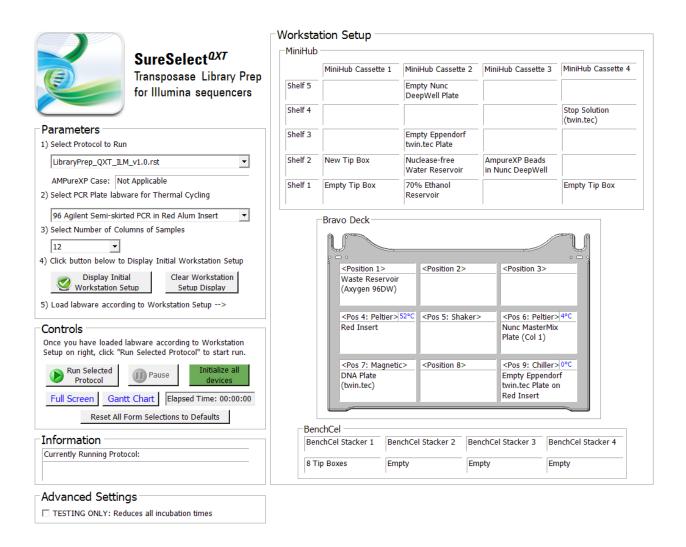
SureSelectQXT\_ILM\_v1.0.VWForm を使用したランの設定と開始 VWorks を起動すると、下に示す SureSelectQXT\_ILM\_v1.0.VWForm が画面に現れます。この画面 上で、各 SureSelect 自動化プロトコルまたはランセットの設定および開始を行います。

	Worksta	tion Setup			
SureSelect <sup>QXT</sup>	MiniHub				
Transposase Library Prep		MiniHub Cassette 1	MiniHub Cassette 2	MiniHub Cassette 3	MiniHub Cassette 4
for Illumina sequencers	Shelf 5				
	Shelf 4				
Parameters	Shelf 3			-	-
) Select Protocol to Run					
LibraryPrep_QXT_ILM_v1.0.rst  ▼	Shelf 2				
AMPureXP Case:	Shelf 1			-	-
) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling					
96 Agilent Semi-skirted PCR in Red Alum Insert		Bravo Deck			
) Select Number of Columns of Samples		a F			- A
1					
Click button below to Display Initial Workstation Setup		<position 1=""></position>	<position 2=""></position>	<position 3=""></position>	
Display Initial Clear Workstation Workstation Setup Display					
) Load labware according to Workstation Setup>		<pos 4:="" peltier=""></pos>	<pos 5:="" shaker<="" td=""><td>&gt; <pos 6:="" peltier<="" td=""><td>×  </td></pos></td></pos>	> <pos 6:="" peltier<="" td=""><td>×  </td></pos>	×
Controls					
Once you have loaded labware according to Workstation Setup on right, click "Run Selected Protocol" to start run.					
Run Selected Protocol Pause Initialize all devices		<pos 7:="" magneti<="" td=""><td>c&gt; <position 8=""></position></td><td><pos 9:="" chiller<="" td=""><td><u> </u></td></pos></td></pos>	c> <position 8=""></position>	<pos 9:="" chiller<="" td=""><td><u> </u></td></pos>	<u> </u>
Full Screen Gantt Chart Elapsed Time: 00:00:00					
Reset All Form Selections to Defaults					
information		chCel Stacker 1 Ber	nchCel Stacker 2 Be	nchCel Stacker 3 Be	enchCel Stacker 4
Currently Running Protocol:	Ber	iciicei Stacker 1 Ber	icircel stacker 2	incincer stacker 3	entricel Stacker 4
Advanced Settings					

- 1. デスクトップの SureSelectQXT\_ILM\_v1.0.VWForm ショートカットを使ってこのフォームを開きます。
- 2. フォームのドロップダウンメニューから、適切な SureSelect ワークフローステップとサンプルのカラム数を選択します。
- 3. このフォームですべてのランのパラメータを決定したら、Display Initial Workstation Setup をクリックします。



4. フォーム上の Workstation Setup の部分には、Bravo、BenchCel、MiniHub のそれぞれについて、 決定したランパラメータに応じて必要となる試薬と実験器具をセットする場所が示されます。この指定 場所を間違えると、自動化プロトコルは正常にランされませんので、必ずダブルチェックするようにしてください。



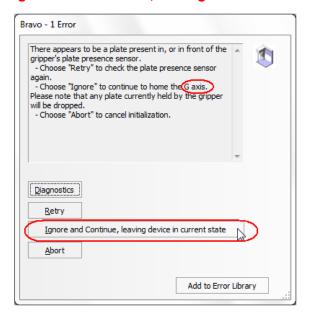
5. SureSelect<sup>XT</sup> 自動化システムが正しくセットアップされたことを確認したら、**Run Selected Protocol** をクリックしてください。



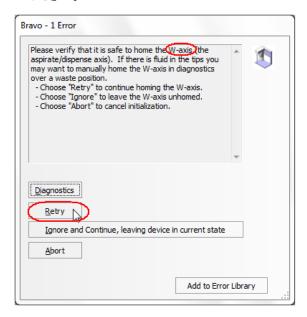
#### Bravo の初期化

Bravo の電源を入れて最初に VWorks をスタートしたときには、Bravo の初期化の動作に伴い、必ず画面に下記のエラーメッセージが 2 回出ます。必ず下記の指示にしたがって、操作してください。この時点で選択を間違えると、初期化が正しく行われず、プロトコルをランしている途中にエラーで止まってしまいます。正しい選択を行うように注意ください。

1. 最初はグリッパーの初期化に伴う G axis のエラー表示が出ます。このエラー表示が出たら、常時 Ignore and Continue, leaving device in current state を選択してください。



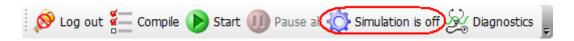
2. 次に W-axis の初期化に伴うエラー表示が出ます。このエラー表示が出たら、常時 Retry を選択してください。



#### シミュレーション設定の確認

VWorks ソフトウェアはシミュレーションモードで実行することもでき、その間はスクリーンで入力したコマンドは Agilent NGS 自動化システムでは実行されません。ランを開始してもワークステーションの装置が反応しない場合、以下の操作を行い、VWorks でのシミュレーションモードの状態を確認してください。

1. ステータスインジケータに Simulation is off と表示されていることを確認してください。 (View > Control Toolbar とクリックするとステータスインジケータが表示されます。)



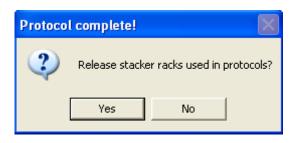
2. そのインジケータに Simulation is on と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押してシミュレーションモードをオフにしてください。

NOTE

SureSelect\_XT\_Illumina VWorks フォームにツールバーが見えない場合、Full Screen on/off をクリックしてフルスクリーンモードを終了してください。それでもツールバーが見えない場合には、フォーム上で右クリックし、メニューから Control Toolbar を選択してください。

#### プロトコルまたはランセットの終了

下のウィンドウはランが完了すると表示されます。**Yes** をクリックして BenchCel ラックを解放し、次の.pro または.rst でのランに備えるために使った試薬などを取り除いてください。ただしプロトコルによっては引き続き使用するプレートやラックもありますので、各ステップでの指示にしたがってください。



#### VWorks の終了

Administrator もしくは Technician モードで VWorks を使用している場合は、VWorks を通常の操作で Close できますが、Operator モードで使用している場合、そのまま VWorks を close することができません。下記の手順で Close してください。

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



2. 画面上部の Control Toll Bar から LogOut のアイコンをクリックします。



- もし Control Tool Bar が画面に出ていない場合は、画面上部の View のメニューをクリックし、その中
  - の Control Toll Bar を選択した状態にしてください。
- 3. Log out すると、このボタンが Log in に変わります。下記のユーザー名と password でログインしてください。

User Name : administrator Pass word : administrator

4. ログイン後ただちに、VWorks を Close してください。ここで万一プロトコルを変更してしまうと、上書きされてしまう怖れがあります。ログイン後は操作をせずに、ただちに Close してください。

## SureSelect QXT Target Enrichment Procedure の概要

イルミナ社のペアエンドシーケンスプラットフォームを用いてライブラリを調製する際の SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントのワークフローを図 3 で説明します。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 Index(バーコード)シーケンスを各サンプルに付加します。 SureSelectQXT Library Prep kits.に含まれている dual index タグを使用することで、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が行えます。イルミナ社のマルチプレックスシーケンスでは、1 ランに用いる 1 フローセルのすべてのレーンをマルチプレックスシーケンスにする必要があります(ご使用のバージョンによっては、この制限がない場合もあります)。詳細はイルミナ社のプロトコルを参照ください。

表 7 には、SureSelect QXT のワークフローの中で使われる VWorks のプロトコルがまとめてあります。 サンプルを処理する際に使用される VWorks プロトコルの詳細な説明については、サンプル調製、ハイブリダイゼーション、およびマルチプレックスシーケンスのための Index 付加とサンプル準備の各章を参照してください。

# SureSelect QXT NGS Target Enrichment Workflow

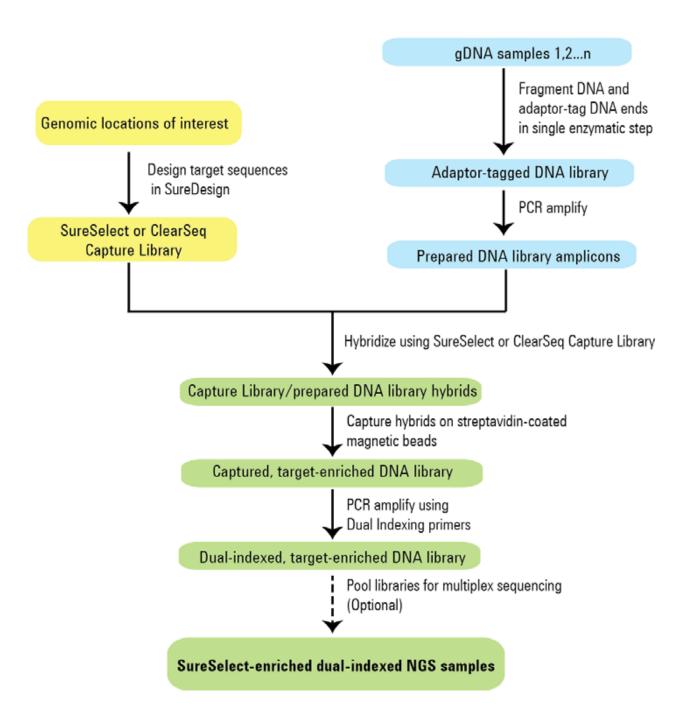


図3 サンプル調製ワークフロー

# 表 7 ワークフローで使用される VWorks プロトコルおよびランセットの概要

Workflow Step (Protocol Chapter)	Substep	VWorks Protocols Used for Agilent NGS Workstation automation
	Prepare fragmented and adaptor-tagged DNA	LibraryPrep_QXT_ILM_v1.0.rst
Sample Preparation	Amplify adaptor-tagged DNA	Pre-CapturePCR_QXT_ILM_v1.0.pro
	Purify DNA using AMPure XP beads	AMPureXP_0XT_ILM_v1.0.pro:Pre-Capture PCR
	Aliquot prepped libraries for hybridization	Aliquot_Libraries_v1.0.pro
Hybridization	Hybridize prepped DNA to Capture Library	Hybridization_OXT_v1.0.pro
	Capture and wash DNA hybrids	SureSelect0XT_Capture&Wash_v1.0.rst
Indexing	Add index tags by PCR	Post-CapturePCR_OXT_ILM_v1.0.pro
	Purify DNA using AMPure XP beads	AMPureXP_0XT_ILM_v1.0.pro:Post-Capture PCR

## 自動化ランを行う上での実験条件の検討

Agilent NGS 自動化システムを用いて、Illumina プラットフォームでシーケンスするために処理できる gDNA サンプルの数は、1、2、3、4、6、または 12 カラム(8、16、24、32、48、または 96 ウェルに相当) から選択できます。ただし、自動化用の試薬は 24 検体単位で使用したときに過不足がないように調整されているので、24 より少ない検体数でランしたときには、試薬が 96 検体分には足りなくなります。できるだけ 24 検体単位で処理するように、実験計画を立ててください。

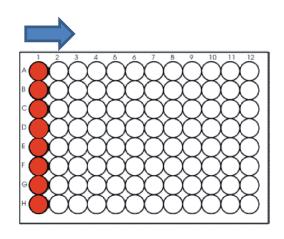
表8 カラム数とサンプル数の対応表

カラム数	総サンプル数
1	8
2	16
3	24
4	32
6	48
12	96

各 96 反応分のキットは、1 ランあたり 3 カラム (24 検体分)の実験を 4 回行うために必要な試薬量を含んでいます。

### 自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる gDNA サンプルの場所について

Agilent NGS 自動化システムは、サンプルの処理を常にカラム(Column、列)単位で行い、カラム1 がスタートポイントとなります。よって、gDNA サンプルは96 ウェルプレートにカラム単位でセットし、A1 から H1 へ、次にA2 から H2 へ、最後にA12 から H12 という順番でセットするようにします。12 サンプルカラムより少ないカラム数でランを行うときには、サンプルカラム間に間を空けず、つねに左のカラムから隙間のないように、サンプルをセットするようにします。



- ハイブリダイゼーションのステップ(図 3)では、プレートの各ロウ(Row、行)に異なる種類の SureSelect Capture Library をセットすることができます。調製したアダプター付き DNA ライブラリ が適切な SureSelect Capture Library と一致するように実験を計画してください。詳細はハイブリ ダイゼーションの項目を参照ください。
- キャプチャ後の増幅ステップ(図 3)では、キャプチャターゲットのサイズの違いによって PCR 増幅 サイクル数が異なることがあります。同じ PCR サイクル数となるターゲットサイズの Capture Library を同じプレートで処理するようにしてください。詳細はキャプチャ後の増幅ステップの項目を 参照ください。
- キャプチャ後の SureSelect ライブラリへの dual Index タグの割り当てと gDNA サンプルの 96 ウェルプレート上の位置を対応させておく必要があります。例えば、DNA サンプルプレートの同じロウのサンプルはすべて同じ P5 index プライマーが割り当てられます。実験を開始する前に p.94 の「Index プライマーの割り当ての決定」および p.125 の「dual Index プライマーの割り当てガイドライン」を参照して、Index と gDNA サンプルが適切に配置されるように計画することが重要です。

#### 装置の設置について

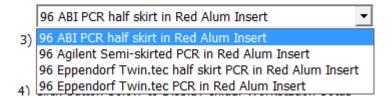
- ワークフローのハイブリダイゼーションのステップでは、Bravo デッキとサーマルサイクラとの間でサンプルプレートを迅速に動かす必要があります。使用するサーマルサイクラを Agilent NGS 自動化システムのできるだけ近くに設置し、迅速で効率的なプレート移動ができるようにしてください。
- ワークフローのステップの中には、サンプルプレートを PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールした後、遠心してスピンダウンするステップがあります。効率をよくするために、遠心機を Agilent SureSelect<sup>XT</sup> 自動化システムの近くに設置するようにしてください。

#### PCR プレートのタイプについて

本自動化プロトコルの中では、サンプルをサーマルサイクラに移す前の準備として、PCR プレートに試薬やサンプルを分注するステップが複数あります。これらのステップでは、各プレートに応じた正しいリキッドハンドリング作業を行うために、SureSelectQXT\_ILM\_v1.0.VWForm 上で、使用する PCR プレートの種類を指定する必要があります。自動化プロトコルを開始する前に、使用予定の PCR プレートが、本システムでサポートされた、下記の何れかの PCR プレートであることを確認して下さい。

実験で使用するPCRプレートの種類は、以下のメニューで指定します。

2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling



## **CAUTION**

サポートされている各 PCR プレートのベンダーと型番の情報は、表 9 に記載されています。様々なタイプのサーマルサイクラが使用可能となっています。

表 9 のプレートのうちいくつかのプレートは使用を推奨している SureCycler 8800 サーマルサイクラに適していません。本自動化プロトコルで SureCycler 8800 サーマルサイクラを使用する際には 96 Agilent semi-skirted PCR plate を使用してください。

SureCycler 8800 サーマルサイクラ以外のサーマルサイクラをご利用になる際は表 9 のプレートの中から使用予定のサーマルサイクラで使用可能なプレートを選択して下さい。

#### 表 9 サポートされている PCR プレートの型番情報

Description in VWorks menu	Vendor and part number
96 ABI PCR half-skirted plates (MicroAmp Optical plates)	Life Technologies p/n N8010560
96 Agilent semi-skirted PCR plate	Agilent p/n 401334
96 Eppendorf Twin.tec half-skirted PCR plates	Eppendorf p/n 951020303
96 Eppendorf Twin.tec PCR plates (full-skirted)	Eppendorf p/n 951020401 or 951020619



STEP1.	DNA サンフルと試楽の準備	38
STEP2.	Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加	40
STEP3.	アダプター付き gDNA ライブラリの増幅	47
STEP4.	AMPure XP ビーズによるアダプター付き gDNA ライブラリの精製	55
STFP5	雷気泳動による aDNA ライブラリのサイズチェックと定量	59

この章では、イルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンスプラットフォームでランするための DNA ライブラリを、Agilent NGS 自動化システムを用いて調製する方法を説明します。マルチプレックスシーケンスを行うサンプルは、96 ウェルプレートのウェルの中で個別に、ライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、およびキャプチャのステップが行われます。キャプチャ後のサンプルを PCR 増幅するときに、あわせて Index(バーコード)シーケンス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、SureSelect QXT ターゲットエンリッチメントキットに含まれるイルミナシーケンサ用の Index タグを使って、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うことができます。

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 システムの使用を強くお勧めします。

## STEP1 DNA サンプルと試薬の準備

SureSelect QXT 自動化システムライブラリ調製を開始する前に、実験に必要なものを準備することが重要です。このステップでは、サンプル gDNA を慎重に定量し、サンプルプレートに入れていきます。調製や常温に戻すことが必要な試薬もこのステップで準備します。

- 1. SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2 (-20°C保存)から DMSO チューブを取り出します。 DMSO チューブは p.48 で使用するまで室温に置きます。
- 2. プロトコル p.41 および p.55 の精製ステップで用いる試薬を準備します。
  - 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 150 ml 調製します。同じ日に実施する別の精製ステップで用いる 70% エタノールをここで調製し、密閉して置いておくことは出来ますが、エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、調整済み 70% エタノールはその日の内に使い切ることを推奨致します。
- 3. SureSelect QXT Hyb Module Box 1(常温保存)から SureSelect QXT Stop Solution を取り出し、 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ください。

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おいてください。

調製済みの 1x SureSelect QXT Stop Solution は p.42 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。

- 4. 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ください。 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/uL の濃度に希釈します。
  - c. 再度 Qubit dsDNA BR または HS Assay を用いて、100 ng/uL 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 10 ng/uL に調整してください。
- Agilent NGS 自動化システムで処理するために、10 ng/ul の gDNA サンプルを 5 ul ずつ 96 ウェル Eppendorf プレートのウェルにカラムごとに A1 から H1、A2 から H2、最後に A12 から H12 の順番で移します。

# NOTE

Agilent NGS 自動化システムを用いて、Illumina プラットフォームでシーケンスするために処理できる gDNA サンプルの数は、1、2、3、4、6、または 12 カラム (8、16、24、32、48、または 96 ウェルに相当) から選択できます。 p.34 の「自動化ランを行う上での実験条件の検討」を参照してください。

- 6. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
- 7. プレートを 30 秒間遠心し、プレートの壁やプレートシールについた液をスピンダウンして、気泡を除きます。このプレートは p.45 で使用するまで氷上に置きます。

# STEP2 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、自動化システムのランセット LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst を用いて、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。断片化およびアダプター付加後、自動化システムはアダプター付き gDNA ライブラリを AMPure XP ビーズで精製します。

このステップでは、表 10 に示された SureSelect QXT Reagent Kit に含まれる試薬と、p.38 から p.39で準備をした試薬を使用します。

## 表 10 DNA の断片化とアダプター付加の試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect QXT Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 40
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 40

## ワークステーションと試薬の準備

- 1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。チラーの電源は入れないで OFF のままにして使用してください。
- 2. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が、使用する 96 プレート類に直接かからないようにご注意ください。
- 3. Bravo デッキ 4番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 52 °Cに設定します (Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照してください)。 Bravo デッキ 4番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 1に相当します。 さらに Bravo デッキ 6番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4°Cに設定します。 Bravo デッキ 6番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 2に相当します。
- 4. デッキ 9番のチラーを 0 ℃に設定します。チラーリザーバーには少なくとも 300 ml の 25%エタノールが入っていることをご確認ください。
- 5. 赤いアルミニウムインサートをデッキ4番と9番に載せます。

6. 表 11 にしたがってチップボックスを Bench Microplate Handling Workstation にセットします。

表 11 LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst 用の BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
3	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	4 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	8 Tip boxes	Empty	Empty	Empty

7. P.21 の図 2 に示す向きで、表 14 にしたがって Labware MiniHub に空のプレートやチップボックスなどをセットします。

## AMPure beads によるサンプル精製試薬の準備

- 8. AMPure XP ビーズ懸濁液が室温に戻っていることを確認します。凍結保存はしないようにしてください。
- 9. ビーズ懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- 10. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ懸濁液 55 µL を、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに入れます。このソースプレートを MiniHub のカセット 3、shelf 2 に置きます。
- 11. 15 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。 このリザーバーを MiniHub のカセット 2、shelf 2 に置きます。
- 12. 45 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。リザーバーの側面に nuclease-free 水と区別がつくように印をつけることをお勧めします。
  - このリザーバーを MiniHub のカセット 2、shelf 1 に置きます。

## ライブラリ調製マスターミックスと Stop Solution ソースプレートの準備

13. Eppendorf twin.tec full-skirted PCR プレートを用いて、Stop Solution ソースプレートを準備します。

1 ウェルあたり 35 μL の 1 × SureSelect QXT Stop Solution を使用する各ウェルに入れます。 このプレートを MiniHub のカセット 4、shelf 4 に置きます。

14. 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ダウンします。

これらの試薬は-20℃から取り出した時点で液体であり、使用した後はすぐに-20℃に戻してください。

# 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。

15. 表 12 にしたがって、適切な量のライブラリ調製マスターミックスを準備します。 ボルテックスミキサで 20 秒間撹拌して反応溶液を完全に混ぜたのち、氷上に置きます。

## 表 12 ライブラリ調製マスターミックスの準備

Cura Calant OVT Bangant	Volume for						
SureSelect QXT Reagent	1 Library	1 Column	2 column	3 Column	4 Column	6 Column	12 Column
SureSelect QXT Buffer	17 ul	267.8 ul	412.3 ul	556.9 ul	701.5 ul	1054 ul	2108 ul
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	2 ul	31.5 ul	48.5 ul	65.5 ul	82.5 ul	124 ul	248 ul
Total Volume	19 ul	299.3 ul	460.8 ul	622.4 ul	784 ul	1178 ul	2356 ul

16. Nunc DeepWell plate を用いて、ステップ 15 で準備した溶液を含む Library Prep Master Mix ソースプレートを準備します。

Library Prep Master Mix を表 13 に示すように、Nunc DeepWell プレートのカラム 1 の全てのウェルに入れます。

このマスターミックスは分注する間、氷上に置いてください。このマスターミックスソースプレートは最終的に図4のようになります。

表 13 LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0rst 用のマスターミックスソースプレートの調製

	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
Master Mix Solution	Source Plate	1-column	2-Column	3-Column	4-Column	6-Column	12-Column
		Runs	Runs	Runs	Runs	Runs	Runs
Library Prep Master Mix	Column 1 (A1-H1)	34.9 ul	55.1 ul	75.3 ul	95.5 ul	135.8 ul	267.1 ul

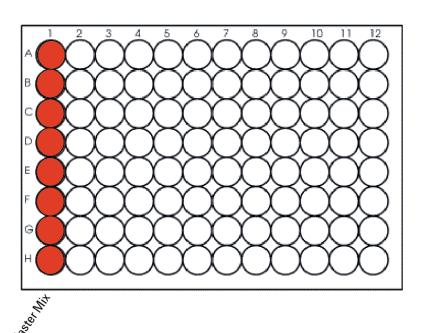


図 4 LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst 用マスターミックスソースプレートのマスターミックスの配置

- 17. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate sealer でシールします。設定は 165℃、1.0 秒です。
- 18. 30 秒間スピンダウンすることで、壁やプレートシールに付いた液を落とし、気泡を除きます。 このマスターミックスソースプレートは氷上に置きます。

# NOTE

ソースプレートの液中に気泡が入っていると、Bravo による正しい液量の移動ができません。自動化システムのランを始める前にソースプレートをシールし、スピンダウンを必ず行ってください。

# Agilent SureSelect QXT 自動化システムのセット

19. プレートの向きに注意して、表 14 にしたがって、MiniHub に試薬をセットします。

表 14 LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty	Empty Nunc DeepWell plate	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Stop Solution source plate from step 13
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf plate	Empty	Empty
Shelf 2	New tip box	Nuclease-free water reservoir from step 11	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 10	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	70% ethanol reservoir from step 12	Empty	Empty tip box

20. 表 15 にしたがって、Bravo デッキにプレートをセットします。

表 15 LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst 用の Bravo デッキの初期配置

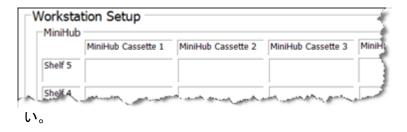
Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
4	Empty red insert
6	Library Prep Master Mix source plate (unsealed)
7	gDNA samples (5 μl of 10 ng/μl DNA per well) in Eppendorf plate (unsealed)
9	Empty Eppendorf plate on red insert

# VWorks ランセット LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst の実行

- 21. セットアップフォームの SureSelect Protocol to Run の下の LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst.を 選択します。
- 22. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 23. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



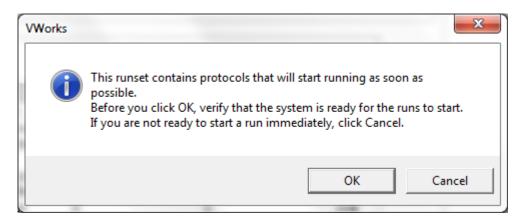
24. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてくださ



- 25. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
- 26. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



27. 開始する準備ができたら、下記のウィンドウの OK をクリックしてください。



LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst ランセットは約1時間かかります。完了すると精製されたアダプター付加 DNA サンプルは Bravo デッキの7番にあるエッペンドルフプレートに入った状態になります。

# STEP3 アダプター付き gDNA ライブラリの増幅

このステップでは、Agilent SureSelectXT 自動化システムはプロトコル Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro を用いて、アダプター付き DNA サンプルの増幅のための溶液分注ステップ を行います。その後、PCR プレートをサーマルサイクラに移し、増幅反応を行います。

このステップでは、表 16 に記載の SureSelect QXT Reagent Kit に含まれる試薬を使用します。

# 表 16 キャプチャ前ライブラリ増幅の試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 48
Herculase II 5× Reaction Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 48
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 48
SureSelect QXT Primer Mix	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, -20°C	page 48
DMS0	Transferred to Room Temperature storage on page 38	page 48

# **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。

#### ワークステーションの準備

- 1. チラーの電源を入れ、0 °Cにセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
- 2. LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst ランで使用した Labware MiniHub のカセット1 shelf1、shelf2 のチップボックスは残し、他のポジションのプレートとチップボックスはすべて片付けてください。
- 3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定(p.19)を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 6 番の温度をあらかじめ 4°C に設定してください。Bravo デッキ 6 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。

4. 表 17 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 17 Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の BenchCel の初期配置

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

# pre-capture PCR マスターミックスとマスターミックスソースプレートの準備

5. 表 18 にしたがって pre-capture PCR マスターミックスを適量調製します。ボルテックスでよく攪拌し、 氷上に置いておきます。

表 18 キャプチャ前 PCR マスターミックスの調製

SureSelect <sup>OXT</sup> Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	13.5 µІ	172.1 µl	286.9 µІ	401.6 µІ	516.4 µІ	745.9 µІ	1491.8 µІ
Herculase II 5X Reaction Buffer	10.0 μL	127.5 µІ	212.5 µl	297.5 µІ	382.5 µІ	552.5 µІ	1105 µІ
DMS0	2.5 μL	31.9 µl	53.1 µl	74.4 µl	95.6 µl	138.1 µl	276.3 µI
dNTP mix	0.5 μL	6.4 μΙ	10.6 µІ	14.9 µl	19.1 μΙ	27.6 µl	55.3 µl
SureSelect QXT Primer Mix	1.0 µL	12.8 µІ	21.3 µІ	29.8 µІ	38.3 µІ	55.3 µІ	110.5 µІ
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1.0 μL	12.8 µІ	21.3 µІ	29.8 µІ	38.3 µІ	55.3 µl	110.5 µl
Total Volume	28.5 µl	363.4 μΙ	605.6 µI	847.9 µl	1090.1 μΙ	1574.6 µI	3149.3 µl

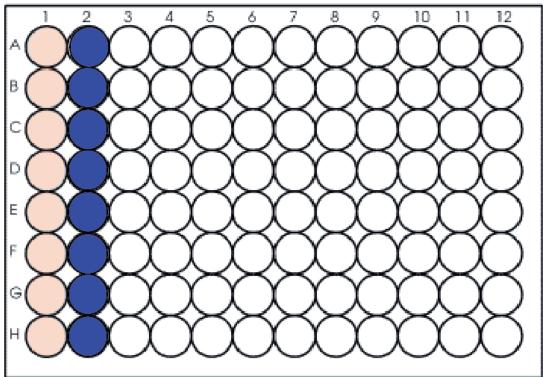
6. LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst のランで用いた Nunc DeepWell マスターミックスソースプレート を使用します。マスターミックスソースプレートのカラム 2 のすべてのウェルに、下記の表 19 に記載されている量の PCR マスターミックスを加えます。このマスターミックスソースプレートは最終的に 図 5 のようになります。

表 19 Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用マスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Pre-Capture PCR Master Mix	Column 2 (A2-H2)	41.9 µІ	72.1 µl	102.4 µІ	132.7 µІ	193.3 µІ	390.1 µІ



pre-capture PCR ソースプレートを新しい Nunc DeepWell プレートで作成する場合でも、 column 1 のウェルはすべて空のまま、column 2 のすべてのウェルに PCR マスターミックス を加えてください。



This series and series of the series of the

# 図 5 Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用マスターミックスソースプレートの配置

- 7. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。 設定は、165°C、1.0 秒です。
- 8. プレートを30秒間遠心し、壁やプレートシールについた液を落とし、気泡を除きます。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo 液体分注プラットフォームで正確に容量が測れないことがあります。必ずソースプレートをランの前にシールし、遠心してください。

# Agilent NGS 自動化システムの実行

9. 表 20 にしたがって Labware MiniHub を準備します。

表 20 Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 2	Clean tip box*	Empty	Empty	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Waste tip box*	Empty	Empty	Empty tip box

<sup>\*</sup>The clean tip box (Cassette 1, Shelf 2) と waste tip box (Cassette 1, Shelf 1) は LibraryPrep\_QXT\_ILM\_v1.0.rst のランの後にそのまま残し、再び使用します。

# NOTE

カセット 1 の Shelf2 に新しいチップボックスを設置する場合はランの前にチップボックスのカラム 1 のチップをすべて取り除いてください。カラム 1 にチップが入っていると Bravo プラットフォームのピペットヘッドが適切に作動せず、クラッシュする危険があります。

10. 表 21 にしたがって Bravo デッキを準備してください。

表 21 Pre-Capture PCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

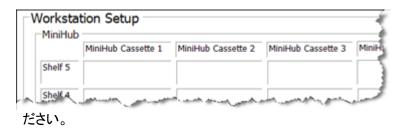
Location	Content
6	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
7	Adaptor-ligated DNA samples in Eppendorf plate
9	Master mix plate containing PCR Master Mix in Column 2 (unsealed)

# VWorks プロトコル Pre-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro の実行

- 11. SureSelect セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の Pre-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro を選択します。
- 12. Select PCR plate labware for Thermal Cycling の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 6 番に設置する PCR プレートのタイプを選択します。
- 13. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 14. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



15. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてく

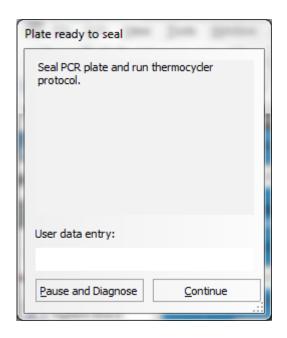


- 16. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
- 17. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



Pre-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro プロトコルの実行には約 15 分かかります。完了すると、DNA サンプルと PCR マスターミックスが混合された PCR-ready サンプルが Bravo デッキ 6 番の PCR プレートに入っています。

18. 次のメッセージが VWorks 画面上に表示されたら、PCR プレートを Bravo デッキの 6 番から取り外し、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165℃、3.0 秒です。



- 19. プレートを30秒間遠心し、壁に付いている溶液を底に集め、気泡を除きます。
- 20. PCR プレートをサーマルサイクラに移し、表 22 に記載されている増幅プログラムを実施してください。

表 22 Pre-Capture PCR サイクルプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	68°C	2 minutes
2	1	98°C	2 minutes
3	8	98°C 57°C 72°C	30 seconds 30 seconds 1 minute
4	1	72°C	5 minutes
<del>-</del>	1	72.0	J IIIIIutes
5	1	4°C	Hold

# STEP4 AMPure XP ビーズによるアダプター付き gDNA ライブラリの精製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムで AMPure XP ビーズと増幅したアダプター付き gDNA ライブラリを Nunc DeepWell プレートに移して撹拌し、ビーズに結合した DNA を洗浄、溶出する操作を実行します。

## ワークステーションと試薬の準備

- 1. Labware MiniHub と BenchCel 上のプレートとチップボックスは、すべて片付けてください。
- 2. AMPure XP ビーズが室温であることを確認してください。(使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4°C 保存)を室温に戻しておくようにします)AMPure XP ビーズは冷凍保存しないように注意してください。
- 3. ビーズ懸濁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ビーズ懸濁液 55 μL を、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに入れます。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、ビーズを入れるようにしてください。
- 5. 20 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- 6. 45 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- 7. 増幅した DNA サンプルの入った PCR プレートを 30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。

8. 表 23 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。ワークステーションの Labware MiniHub にプレートをセットする際は p.21 の図 2 の向き(A1 の位置が MiniHub に正対して手前左 の位置になる)でプレートを置いてください。

表 23 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Pre-Capture PCR 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4	
Shelf 5 (Top)	Empty Nunc DeepWell plate	Empty	Empty	Empty	
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty	
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf Plate	Empty	Empty	
Shelf 2	Empty	Nuclease-free water reservoir from step 5	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 4	Empty	
Shelf 1 (Bottom)	Empty	70% ethanol reservoir from step 6	Empty	Empty tip box	

9. 表 24 にしたがって Bravo デッキにプレートをセットします。 Bravo デッキ 9 番には、赤いアルミニウムインサートを置き、その上にプレートをセットして下さい。

表 24 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Pre-Capture PCR 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
9	Amplified DNA libraries in unsealed PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

10. 表 25 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 25 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Pre-Capture PCR 用の BenchCel の初期配置

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

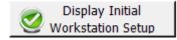
## VWorks プロトコル AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro: Pre-Capture PCR の実行

11. セットアップフォームの Select Protocol to Run の下の AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro: Pre-Capture PCR を選択します。

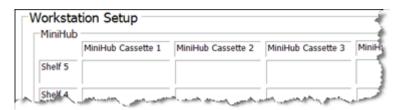
# NOTE

AMPureXP 精製プロトコルは SureSelect の自動化ワークフローで複数回使用します。プロトコルもそれぞれ異なりますので、自動化プロトコルを開始するときには必ず正しいプロトコルを選択するようにしてください。

- 12. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 9 番にある、増幅した DNA ライブラリの入った PCR プレートのタイプを選択します。
- 13. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 14. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



15. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。



- 16. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
- 17. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro: Pre-Capture PCR プロトコルの実行には約45分かかります。完了すると精製 DNA サンプルは Bravo デッキの7番にある Eppendorf のプレートの中に入っています。

# 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 TapeStation D1000 Screen Tape を用いて測定します。

## Option 1: Agilent 2100 バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使用する場合

増幅したライブラリをバイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを用いて測定します。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。

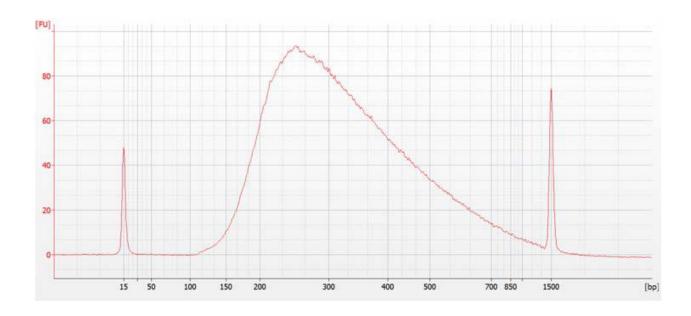
- 1. Agilent 2100 expert ソフトウェアを起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
- 2. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
- 3. 各ウェルのサンプルを均一にするためプレートを 5 秒ボルテックスした後、30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。
- 4. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。分析には各サンプル にあたり 1µL ずつ使用します。
- 5. 調製が終わったチップをバイオアナラ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。
- 6. 結果をチェックします。図 6 のように 245 bp から 325 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。

# 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、Duplication Rate の高い Sequencing データとなる可能性があります。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、On Target %の低い Sequencing データとなる可能性があります。

7. 各ライブラリの濃度を測定します。スメアピーク全体の濃度をバイオアナライザの Smear analysis 機能を用いて定量します。正確な定量のために、得られた濃度がバイオアナライザ DNA 1000 キットの直線範囲内にあることを確認して下さい。

**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 で一晩保存できます。 1日より長く保存する場合は-20°C で保存してください。



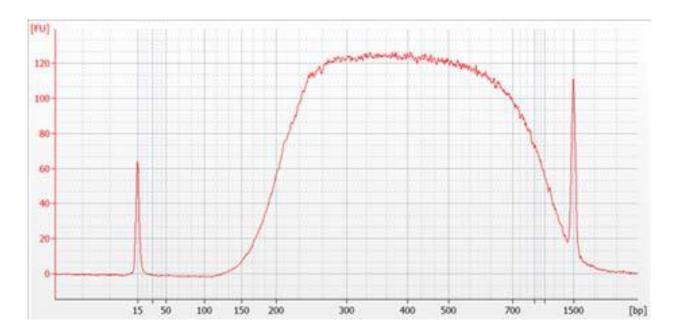


図 6 キャプチャ前 PCR で増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの Bioanalyzer 2100 DNA1000 アッセイの泳動図

## Option 2: 4200(もしくは 2200) TapeStation と D1000 Screen Tape を使用する場合

TapeStation の D1000 ScreenTape (p/n 5067-5582)と専用試薬キット(p/n 5067-5583)を使用します。 TapeStation の操作マニュアルは下記 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. Agilent 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または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。図 7 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、 シングルスメアピークのピークトップがあることを確認します。

## 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、Duplication Rate の高い Sequencing データとなる可能性があります。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、On Target %の低い Sequencing データとなる可能性があります。

4. このスメ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。

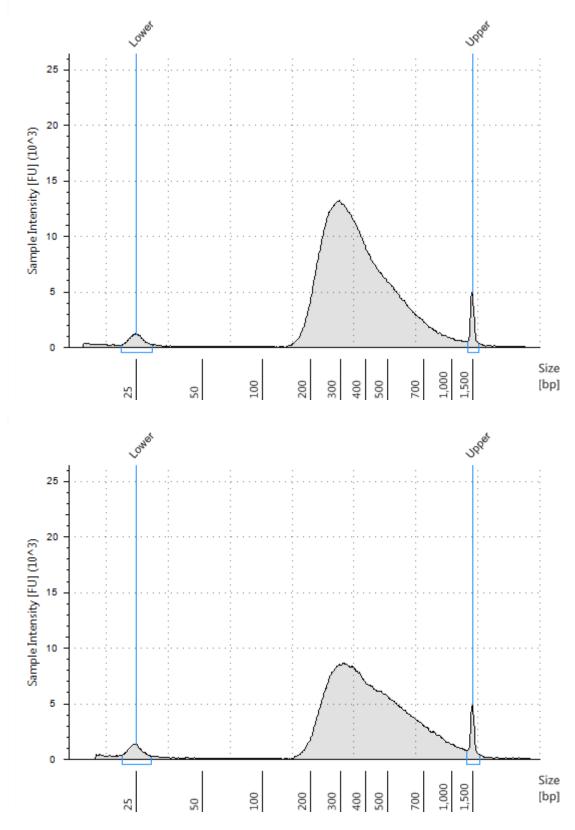


図 7 キャプチャ前 PCR で増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの 2200 TapeStation D1000 ScreenTape で分析した泳動図

## 4. ハイブリダイゼーション



STEP1. ハイブりダイゼーションを行うアダプター付き gDNA サンプルの準備 64 STEP2. gDNA ライブラリとキャプチャーライブラリのハイブリダイゼーション 68 STEP3. ハイブリダイズされた DNA サンプルの回収 82

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 もしく は ClearSeq のキャプチャライブラリを、ブロッキング試薬とともにハイブリダイズします。各アダプター付き gDNA ライブラリサンプルは PCR で Index タグを付加する前に、それぞれ個別にハイブリダイズ、キャプチャを行ってください。

# CAUTION

キャプチャライブラリとアダプタ付き cDNA 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したがって、ハイブリダイゼーションを行ってください。

# STEP1 ハイブリダイゼーションを行うアダプター付き gDNA ライブラリの準備

各サンプルのアダプター付き DNA ライブラリに対して、個別にハイブリダイゼーションとキャプチャを行います。この段階ではサンプルをプールしないでください。

ハイブリダイゼーションに使用するアダプター付き DNA ライブラリの量はキャプチャライブラリのサイズによって異なります。表 26 に示される範囲内で使用可能な最大量を使用してください。

## 表 26 ハイブリダイゼーションに使用するアダプター付き gDNA ライブラリ量

Capture Library Size	Amount of prepared gDNA library used in hybridization
Libraries >3.0 Mb (except ClearSeq DNA Kinome; see below)	750 to 1500 ng DNA
Libraries ≤3.0 Mb and ClearSeq DNA Kinome (3.2 Mb)	500 to 750 ng DNA

p.59 から p.62 の手順で決定した各サンプルの DNA ライブラリ濃度から、下記の式を用いて、ハイブリダイゼーションに使用する各サンプル量を計算します。

各サンプルの必要量(uL) = 750 ng / DNA ライブラリ濃度 (ng/uL)

もしくは

各サンプルの必要量(uL) = 1500 ng / DNA ライブラリ濃度 (ng/ uL)

サンプル量の総量が推奨される使用量より少ない場合は(ClearSeq DNA Kinome かライブラリのサイズが 3.0 Mb 以下の場合では 750 ng、ライブラリサイズが 3.0 Mb 以上の場合では 1500 ng)、すべての DNA サンプルをハイブリダイゼーションに使用してください。

Agilent SureSelect QXT 自動化プロトコル Aliquot\_Libraries\_v1.0.pro でハイブリダイゼーションに使用する各 DNA ライブラリを新しいサンプルプレートに分注します。自動化プロトコルを実施する前に、必要なサンプル量を自動化システムに指示するための表を下記の手順にしたがって作成する必要があります。

## 4. ハイブリダイゼーション

- 1. 図 8 に示すように、ヘッダーをつけた.csv(comma separated value)ファイルを作成します。ヘッダーの文字にはスペースを含まないようにしてください。この表は Microsoft の Excel などのスプレッドシート作成アプリケーションを使って作り、保存する際に.csv フォーマットにすることもできます。このファイルはプレートの全 96 ウェル分の行(Rows)を含む必要があります。
- 2. 各 DNA サンプルについてヘッダーの項目の情報を入力します。
  - SourceBC の列には、サンプルプレートの内容またはバーコードを入力します。SourceBC の列は、すべての Row で同じになります。
  - SourceWell と DestinationWell の列には、プレートでのそれぞれのウェルの位置を入力します。 SourceWell と DestinationWell に書かれた内容は各サンプルについて同じになります。
  - Volume の列には、ハイブリダイゼーションに使用する DNA サンプル量(µL)をそれぞれ入力します(p.64 のガイドラインを参照してください)。図 8 に示すように、プレートの空のウェルにはすべて 0 と入力してください。空のウェルの行は削除しないようにしてください。

	A	В	C	D
1	SourceBC	SourceWell	DestinationWell	Volume
2	SamplePlateXYZ	A1	A1	5.35
3	SamplePlateXYZ	B1	B1	4.28
4	SamplePlateXYZ	C1	C1	4.76
5	SamplePlateXYZ	D1	D1	5.19
6	SamplePlateXYZ	E1	E1	5.49
7	SamplePlateXYZ	F1	F1	4.86
8	SamplePlateXYZ	G1	G1	5.05
9	SamplePlateXYZ	H1	H1	4.37
10	SamplePlateXYZ	A2	A2	0
11	SamplePlateXYZ	B2	B2	0
12	SamplePlateXYZ	C2	C2	0
-13.	Samelo Platok V.Z	وسور ودومه	سمير حسديده	Sugar Park

#### 図8 カラムラン用のサンプル分取のためのサンプルスプレッドシート

# NOTE

サンプルスプレッドシートは下記のディレクトリにあります。

C: > VWorks Workspace > NGS Option B > QXT\_ILM\_v1.0 > Aliquot Library Input Files > Aliquot Libraries full plate template.csv.

Aliquot\_Libraries\_full\_plate\_template.csv ファイルをこのフォルダにコピーし、テンプレートとして Aliquot\_Libraries\_v1.0.pro ランの csv ファイルを作成するために使用できます。12 カラム(96 サンプル)より少ないランのテンプレートとして使用する場合には、96 ウェル分の列(Volume 欄)はそのまま残し、使用しないウェルの Volume 欄を 0 と入力するように注意してください。

- 3. VWorks ソフトウェアがインストールされている PC の次のフォルダに.csv ファイルをロードします。C: > VWorks Workspace > NGS Option B > QXT\_ILM\_v1.0 > Aliquot Library Input Files
- 4. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバー には少なくとも 300 mL の 25% エタノールが入っていることを確認してください。
- 5. 表 27 にしたがって Bravo デッキを準備します。

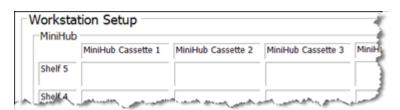
表 27 Aliquot\_Libraries\_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
5	Empty Eppendorf plate
6	Empty tip box
8	New tip box
9	Prepped library DNA in Eppendorf plate

- 6. SureSelect セットアップフォームの **Select Protocol to Run** から **Aliquot\_Libraries\_v1.0.pro** を選択します。
- 7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



8. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。



- 9. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
- 10. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



#### 4. ハイブリダイゼーション

11. 下のダイアログボックスが出たらこのランのソースプレートのために作成した.csv ファイルを指定し、**OK** をクリックしてランを開始します。



この分取プロトコルは 96 サンプルで約 1 時間かかります。完了時には DNA サンプルが Bravo デッキの 5 番にある Eppendorf plate プレートに入った状態になります。

- 12. DNA サンプルのプレートを Bravo デッキからとり、濃縮遠心機で 45°C 以下の温度でサンプルを乾燥させます。
- 13. 乾燥したサンプルそれぞれに 12 μL の nuclease-free 水を加えて再溶解します。各ウェルの内壁 に沿ってピペッティングすることでサンプルをよく再溶解させるよう、十分に注意してピペッティング してください。
- 14. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
- 15. プレートを 30 秒間ボルテックスして乾燥させたサンプルを完全に溶解させます。その後 1 分間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンダウンして気泡を除きます。

# STEP2 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 Agilent SureSelect QXT 自動化システムのプロトコル

Hybridization\_QXT\_v1.0.pro を使用してハイブリダイゼーションを準備する際の溶液分注ステップを実施します。その後、サンプルプレートをサーマルサイクラに移して 65°C で保温し、DNA サンプルと SureSelect キャプチャライブラリ、もしくは ClearSeq キャプチャライブラリをハイブリダイズさせます。

このステップでは表 28 の SureSelect QXT 試薬キットを使用します。各試薬は表中に記載している条件で解凍してください。その後、各試薬をボルテックスで攪拌し、スピンダウンしてください。

## 表 28 ハイブリダイゼーションとキャプチャ用試薬

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	page 74
SureSelect QXT Fast Blocker Mix	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, –20°C	Thaw on ice	page 71
SureSelect RNase Block	SureSelect QXT Hyb Module Box 2, –20°C	Thaw on ice	page 72 or page 73
Capture Library	-80°C	Thaw on ice	page 72 or page 73

#### 4. ハイブリダイゼーション

## サーマルサイクラのプログラム

1. 下記の表 29 にしたがって、ハイブリダイゼーションのワークフローで使用するサーマルサイクラの プログラムを入力しておきます。

ワークフローの最中にサンプルと試薬を必要な温度に保つため、ハイブリダイゼーションの自動化システムをスタートする前にサーマルサイクラを準備しておくことが重要です。

# 表 29 ハイブリダイゼーションで使用するサーマルサイクラプログラム\*

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

<sup>\*</sup> 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 35 uL に設定して下さい(Segment 4 でのハイブリダイゼーション反応における最終的なボリュームは 35 uL になります)。



サーマルサイクラの蓋は熱いため、触ると火傷することがあります。蓋の近くで作業すると きには気をつけてください。

<sup>†</sup> VWorks software にメッセージが表示されたら、この Hold のステップでサンプルを迅速に NGS ワークステーションに移します。

<sup>‡</sup> サンプルは p.82 から開始する Capture & Wash automation プロトコルを実施している間、65℃に保たれます。

# ワークステーションの準備

- 2. Labware MiniHub と BenchCel 上のプレートとチップボックスをすべて片付けてください
- 3. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が使用するプレート類に直接かからないようにご注意ください。
- 4. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは 少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
- 5. Bravo デッキ 4 番に赤いアルミニウムインサートを載せます。
- 6. Bravo デッキの 6 番にシルバーの Nunc DeepWell プレートインサートを置きます。このインサート はハイブリダイゼーションプロトコルの実施中に DeepWell ソースプレートのウェルに熱を伝えやすくするために必要です。
- 7. ワークステーションの MiniHub のカセット4の shelf 2 に空のチップボックスを置いて下さい。
- 8. 表 30 のように BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 30 Hybridization\_QXT\_v1.0.pro 用の BenchCel の初期配置

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

## 4. ハイブリダイゼーション

# ブロックマスターミックスの調製

9. 以下の表 31 にしたがってブロックマスターミックスを調製します。調製中および分取中には氷上におくようにしてください。

表 31 ブロックマスターミックスの準備

SureSelect QXT Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 column	Volume for 3 Column	Volume for 4 Column	Volume for 6 Column	Volume for 12 Column
Nuclease-free water	2.5 ul	49 ul	69 ul	91 ul	111 ul	174 ul	348 ul
SureSelect QXT Fast Blocker Mix (blue cap)	5 ul	98 ul	138 ul	182 ul	222 ul	348 ul	696 ul
Total Volume	7.5 ul	147 ul	207 ul	273 ul	333 ul	522 ul	1044 ul

## キャプチャーライブラリーマスターミックスの調製

10. 各キャプチャライブラリを個別にハイブリダイゼーションするために、表 32 から表 35 に示されている ように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。 高速設定のボルテックスミキサで 5 秒間よく攪拌し、スピンダウンした後、氷上においておきます。

# NOTE

準備した gDNA サンプルプレートの各行は異なるキャプチャライブラリとハイブリダイズすることができます。しかしながら、ライブラリのサイズが異なれば、キャプチャ後の増幅サイクル数が異なります。同じサンプルプレート内では、同程度のサイズのライブラリをハイブリダイズするように実験を計画してください。

プレートのすべての列で同じキャプチャライブラリを使用する場合は、p.72 の Step a (表 32 もしくは表 33) にしたがってマスターミックスを調製してください。

プレートの各列で異なるキャプチャライブラリを使用する場合は、p.73 の Step b (表 34 もし くは表 35) にしたがってそれぞれのマスターミックスを調製してください。

**a.** プレートのすべての行で同じキャプチャライブラリを使用する場合は、キャプチャライブラリのサイズによって表 32 もしくは表 33 にしたがってマスターミックスを調製してください。

表 32 キャプチャライブラリマスターミックスの調製、キャプチャライブラリが 3.0Mb 未満の場合、8Row 分

Terget size <3.0Mb										
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 column	Volume for 3 Column	Volume for 4 Column	Volume for 6 Column	Volume for 12 Column			
Nuclease-free water	4.5 ul	90 ul	126 ul	162 ul	198 ul	306 ul	612 ul			
Rnase Block (purple cap)	0.5 ul	10 ul	14 ul	18 ul	22 ul	34 ul	68 ul			
Capture Library	2.0 ul	40 ul	56 ul	72 ul	88 ul	136 ul	272 ul			
Total Volume	7.0 ul	140 ul	196 ul	252 ul	308 ul	476 ul	952 ul			

# 表 33 キャプチャライブラリマスターミックスの調製、キャプチャライブラリが 3.0Mb 以上の場合\*、8Row 分

Terget size >3.0Mb										
Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 column	Volume for 3 Column	Volume for 4 Column	Volume for 6 Column	Volume for 12 Column			
Nuclease-free water	1.5 ul	30 ul	42 ul	54 ul	66 ul	102 ul	204 ul			
Rnase Block (purple cap)	0.5 ul	10 ul	14 ul	18 ul	22 ul	34 ul	68 ul			
Capture Library	5.0 ul	100 ul	140 ul	180 ul	220 ul	340 ul	680 ul			
Total Volume	7.0 ul	140 ul	196 ul	252 ul	308 ul	476 ul	952 ul			

<sup>\*</sup> ClearSeq DNA Kinome XT Library (3.2 Mb)を含む

b. プレートの各行で異なるキャプチャライブラリを使用する場合は、キャプチャライブラリのサイズによって、表 34 もしくは表 35 にしたがって、各マスターミックスを調製してください。表 34 もしくは表 35 はサンプルウェルの 1 行分の試薬量を示しています。表中の必要なカラム数の下に記載されている量にしたがってください。

# 表 34 キャプチャライブラリマスターミックスの調製、キャプチャライブラリが 3.0Mb 未満の場合、1Row 分

Target Size < 3.0 Mb							
Reagent	Volume for						
Neagent	1 library	1 column	2 column	3 column	4 column	6 column	12 column
Nuclease-free water	4.5 ul	11.25 ul	15.75 ul	20.25 ul	24.75 ul	38.25 ul	76.5 ul
Rnase Block	0.5 ul	1.25 ul	1.75 ul	2.25 ul	2.75 ul	4.25 ul	8.5 ul
(purple cap)  Capture Library	2.0 ul	5 ul	7 ul	9 ul	11 ul	17 ul	34 ul
Total Volume	7.0 ul	17.5 ul	24.5 ul	31.5 ul	38.5 ul	59.5 ul	119 ul

# 表 35 キャプチャライブラリマスターミックスの調製、キャプチャライブラリが 3.0Mb 以上の場合\*、1Row 分

Target Size ≥ 3.0 Mb							
Reagent	Volume for						
	1 library	1 column	2 column	3 column	4 column	6 column	12 column
Nuclease-free water	1.5 ul	3.75 ul	5.25 ul	6.75 ul	8.25 ul	12.75 ul	25.5 ul
Rnase Block	0.5 ul	1.25 ul	1.75 ul	2.25 ul	2.75 ul	4.25 ul	8.5 ul
(purple cap)							
Capture Library	5.0 ul	12.5 ul	17.5 ul	22.5 ul	27.5 ul	42.5 ul	85 ul
Total Volume	7.0 ul	17.5 ul	24.5 ul	31.5 ul	38.5 ul	59.5 ul	119 ul

<sup>\*</sup> ClearSeq DNA Kinome XT Library (3.2 Mb)を含む

# Hybridization Buffer マスターミックスの調製

• 表 36 にしたがって**室温で** Hybridization Buffer マスターミックスを調製してください。

表 36 Hybridization Buffer マスターミックスの調製

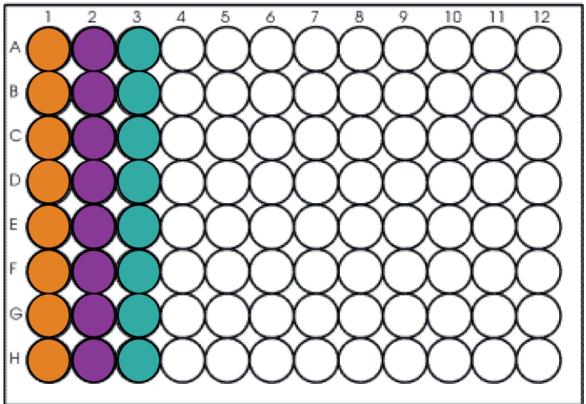
SureSelect <sup>OXT</sup> Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 μΙ	53.1 µl	74.4 µI	95.6 µl	116.9 μΙ	159.4 µl	297.5 μΙ
SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer (yellow cap)	6.0 µl	127.5 µІ	178.5 µІ	229.5 µІ	280.5 µІ	382.5 µl	714.0 µІ
Total Volume	8.5 µl	180.6 μΙ	252.9 μΙ	325.1 µl	397.4 µl	541.9 μl	1011.5 µІ

#### マスターミックスソースプレートの準備

• Step 9 から Step11 で調製したマスターミックスを Nunc DeepWell プレートに分注して、マスターミックスソースプレートを室温で作成します。表 37 に示された量のマスターミックスを Nunc DeepWell プレートの各カラムの各ウェルにそれぞれ加えます。複数のキャプチャライブラリを使用する場合は、各キャプチャライブラリマスターミックスは Nunc DeepWell プレートの該当する行に加えます。最終的にマスターミックスソースプレートは下の図 9 のようになります。

# 表 37 Hybridization\_QXT\_v1.0.pro で使用するマスターミックスソースプレートの準備

Master Mix	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate						
Solution	Source Plate	1-column	2-Column	3-Column	4-Column	6-Column	12-Column	
Solution	Source Flate	Runs	Runs	Runs	Runs	Runs	Runs	
Divil Marta M	Column 1	17	24 El	32 ul	39.5 ul	58 ul	107 ul	
Block Master Mix	(A1-H1)	17 ul	24.5 ul	32 UI	59.5 UI	oo ui	107 ui	
Capture Library	Column 2	16 ul	22 1	30 ul	l 37 ul	55 ul	110 ul	
Master Mix	(A2-H2)	16 01	23 ul	30 ui			110 ui	
Hybridization	Column 3	10.0	20l	20	47	CE 1l	100.0	
Buffer Master Mix	(A3-H3)	19.9 ul	29 ul	38 ul	47 ul	65.1 ul	123.8 ul	



Solot Habitation of the Cooking Habitation o

# 図 9 Hybridization\_QXT\_v1.0.pro で使用するマスターミックスソースプレートの配置

- 13 マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。 設定は、165°C、1.0 秒です。
- 14 プレートを 30 秒間、1000 g で遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンダウンし、気泡を除きます。このマスターミックスソースプレートは室温においておきます。

#### Bravo デッキの準備

15 表 38 にしたがって Bravo デッキを準備してください。

表 38 Hybridization\_QXT\_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

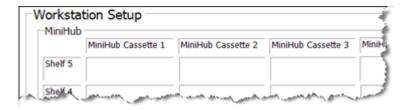
Location	Content
4	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
5	Empty Eppendorf plate
6	Master Mix source plate (unsealed) seated on silver Nunc DeepWell insert
8	Empty tip box
9	Prepared gDNA aliquots in Eppendorf plate (unsealed)

# VWorks protocol Hybridization\_QXT\_v1.0.pro の実行

- 16 SureSelect セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **Hybridization\_QXT\_v1.0.pro** を選択してください。
- 17 **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 4 番に乗せる PCR プレートのタイプを選択します。
- 18 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 19 Display Initial Workstation Setup をクリックします。



20 NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。



21 ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

22 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



Agilent NGS 自動化システムが SureSelect ブロックマスターミックスを分注したサンプルプレートのウェル内で gDNA サンプルを混合します。このプロセスの終了後、サンプルプレートをサーマルサイクラに移し、ハイブリダイゼーションの前にサンプルの変性とブロッキングを行います。

23 VWorks に次のメッセージが出ます。赤いアルミニウムインサートは残したままで、Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを外してください。プレートを外した後に **Continue** をクリックします。



24 取り外した PCR プレートは PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。 設定は 165℃、3.0 秒です。

25 シールした PCR プレートをサーマルサイクラに移します。 p.69 の表 29 のとおりにあらかじめ設定したプログラムを起動します。 設定しておいたプログラムのうち、サンプルの変性とブロッキングを行う工程は下記の図 10 に示す部分です。

Segment Number	Purpose	Number of Cycles	Temperature	Time
1	Denaturation	1	95°C	5 minutes
2	Blocking	1	65°C	10 minutes
3	Hold for NGS workstation steps <sup>†</sup>	1	65°C	Hold

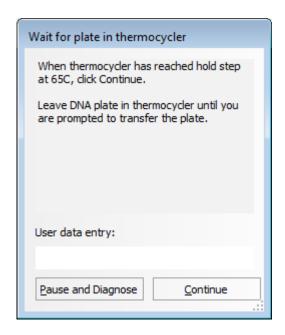
図 10 ハイブリダイゼーション前のサンプルの変性およびブロッキングを行うためのサーマルサイク ラのプログラム

サーマルサイクラでサンプルプレートをインキュベートしている間に、Agilent NGS 自動化システムは キャプチャライブラリマスターミックスと Hybridization Buffer マスターミックスを混合します。

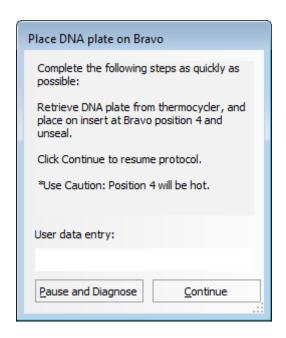
# CAUTION

Step 25 と Step 29 は VWorks software の実行終了後直ちに、素早く行う必要があります。 PCR プレートが Agilent NGS 自動化システムからサーマルサイクラに移動する際にサンプルの温度が約  $65^{\circ}$ Cを維持することが重要です。

26 Agilent NGS 自動化システムがキャプチャライブラリマスターミックスと Hybridization Buffer マスターミックスの混合を終了すると、VWorks 画面に次のメッセージが表示されます。サーマルサイクラが 65°Cの Hold のステップに達したのを確認した後、**Continue** をクリックします。PCR プレートは VWorks 画面で通知されるまでサーマルサイクラの中に置いたままにしてください。



27 VWorks 画面に次のメッセージが表示されたら、サーマルサイクラから PCR プレートを素早く取り出し、液がはねないように注意深くプレートからシールをはがします。Bravo デッキの 4 番の赤いアルミニウムインサートの上に PCR プレートを移します。 **Continue** をクリックします。



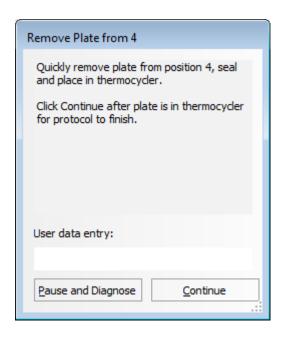
WARNING

Bravo デッキ 4 番は高温です。

高温のデッキに接触しているものを扱う際には注意してください。

Agilent NGS 自動化システムはキャプチャライブラリマスターミックスと Hybridization Buffer マスターミックスを混合した溶液を、gDNA サンプルとブロッキング試薬を混合した溶液が入った PCRプレートに移します。

28 VWorks 画面に次のメッセージが表示されたら、PCR プレートを Bravo デッキ 4 番の上から素早く取り外します。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。



- 29 取り外したサンプルプレートは PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165℃、3.0 秒です。
- 30 サンプルプレートを素早くサーマルサイクラ(65°Cで Hold の状態)に戻します。あらかじめ設定しておいたサーマルサイクラのプログラムのうち、segment 4 をスタートしてください(p.69 の表 29 参照)。この段階では、ブロッキングした DNA サンプルをキャプチャライブラリにハイブリダイズします。

# **CAUTION**

サーマルサイクラでのプレートの温度は 105°C の加温式の蓋(heat lid)を用いて、65°C で使用します。サーマルサイクラの蓋は熱く、火傷を起こすことがあります。蓋の近くで作業するときには気をつけてください。

- 31 サーマルサイクラでハイブリダイゼーションを開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。
- 32 VWorks のプロトコルと終了します。Unused Tips と Empty Tip box のダイアログでは Continue をクリックし、Protocol Complete ダイアログでは Yes をクリックしてください。

### STEP3 ハイブリダイズされた DNA のキャプチャ

このステップでは SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst to automate プロトコルを使用して、gDNA とキャプチャライブラリのハイブリッドをストレプトアビジンでコーティングされた磁性ビーズでキャプチャします。Capture & Wash プロトコル(下記の Step1 から p.85 の Step16 まで)は P.81 で開始したサーマルサイクラでのハイブリダイゼーションプロトコルを実施している間に完了させる必要があります(ハイブリダイゼーションには約 1.5 時間かかります)。

Capture & Wash のランには表 39 に記載されている SureSelect QXT Reagent Kit 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性ビーズを用います(p.12 の表 1 参照)

#### 表 39 ハイブリッドキャプチャの試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	page 83
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	page 84
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect QXT Hyb Module Box 1, RT	page 84

#### ワークステーションの準備

- 1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けてください。
- 2. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
- 3. Bravo デッキ 4 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 66°C に設定します(Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照してください)。 Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
- 4. 赤の PCR プレートインサートを Bravo デッキ 4番にセットします。
- 5. Bravo デッキの 6 番にシルバーの Nunc DeepWell プレートインサートを置きます。このインサート は Capture & Wash プロトコルの実施中に DeepWell ソースプレートのウェルに熱を伝えやすくす るために必要です。ソースプレートをシルバーの DeepWell インサートの上に載せる際には、確実 に熱が伝わるように正しくプレートが載っているか確認してください。

# Dynabeads ストレプトアビジンビーズの準備

- 6. Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁性ビーズをボルテックスで激しく攪拌します。磁性ビーズは保存の間に底に沈んでいます。
- 7. ビーズを次の手順で洗浄します。
  - a. コニカルチューブに下記の表 40 に記載されている試薬を加えて混合します。この分量はピペットロス分を含んでいます。

表 40 磁性ビーズ洗浄作業で使用する試薬

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

- b. ボルテックスで 5 秒間ビーズを攪拌します。
- c. ビーズの入ったチューブを Dynal magnetic separator のような専用の磁石にセットします。
- d. 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。一回の洗浄毎に表 40 に記載されている量の新しい SureSelect Binding Buffer を加えて保持されたビーズと混合してください。
- 8. ビーズを下記の表 41 に記載されている量の SureSelect Binding Buffer で再懸濁します。

表 41 SureSelectQXT Capture&Wash v1.0.rst で使用する磁性ビーズの準備

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
SureSelect Binding Buffer	0.2 ml	1.7 ml	3.3 ml	4.9 ml	6.6 ml	10 ml	20 ml

- 9. 洗浄した Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁性ビーズを分注した Nunc DeepWell ソースプレートを準備します。 懸濁したビーズ溶液を Nunc DeepWell プレートの各ウェルに 200 uL ずつ加えます。
- 10. Bravo デッキの 5番にビーズ溶液を分注した Nunc DeepWell ソースプレートを置きます。

# Capture and washwash solution ソースプレートの準備

- 11. 15 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- 12. Eppendorf プレートに Wash #1 と記入し、各ウェルに 160 uL ずつ SureSelect Wash Buffer 1 を加えます。
- 13. 新しい Nunc DeepWell ソースプレートに Wash #2 と記入し、各ウェルに 1150 uL ずつ SureSelect Wash Buffer 2を加えます。

# Agilent NGS 自動化システムの実行

14. .21 ページの図 2 に示すプレートの向きを参考に、表 42 にしたがって Labware MiniHub をセットします。

表 42 SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst 用の Labware MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty Eppendorf plate	Empty	Wash #1 Eppendorf source plate	Empty
Shelf 2	Empty	Nuclease-free water reservoir	Empty	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Empty	Empty	Empty	Empty tip box

15. 下記の表 43 にしたがって Bravo デッキを準備します。Bravo デッキ 5 番には既に Streptavidin ビーズの入った Nunc DeepWell ソースプレートがセットされています。

表 43 SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
4	Empty red insert
5	Dynabeads streptavidin bead DeepWell source plate
6	Wash #2 DeepWell source plate seated on silver Nunc DeepWell insert

16. 下記の表 44 にしたがってチップボックスを BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 44 SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst 用の BenchCel 初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
2	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
3	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	4 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	6 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	10 Tip boxes	2 Tip boxes	Empty	Empty

# VWorks プロトコル SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst の実行

p.81 から開始したハイブリダイゼーション(約1時間)が終了し、サーマルサイクラのプログラムが Segment 5.の 65°Cで Hold するステップに到達したことを確認した後、VWorks 画面から SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst をスタートさせます。

SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst の実行には約 90 分かかります。約 90 分の自動化プロトコルを実行している間に、オペレーターは NGS 自動化システムの傍について、下記の表 45 に記載されているタイミングで操作をする必要があります。それぞれの操作は VWorks がメッセージを出した時に行います。

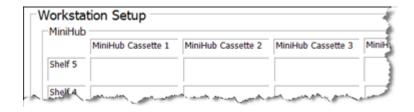
表 45

Operator action	Approximate time after run start
Transfer hybridization reactions from thermal cycler to NGS workstation	<5 minutes
Remove PCR plate from red aluminum insert	5-10 minutes

- 17. セットアップフォームの Select Protocol to Run の下の SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst.を選択します。
- 18. Select PCR plate labware for Thermal Cycling の下のプルダウンメニューから、ハイブリダイゼーションに使用した PCR プレートのタイプを選択します。このプレートは VWorks のプロトコル実行中にサーマルサイクラから Bravo デッキの 4番に移されます。
- 19. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 20. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



21. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。

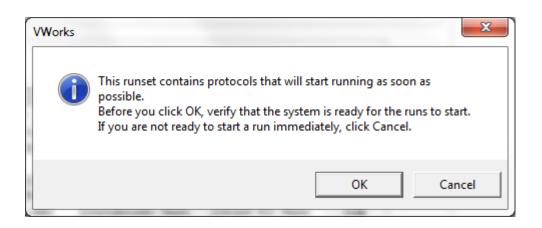


22. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

23. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



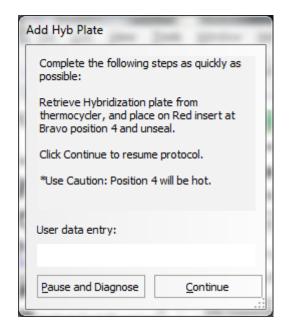
24. ランの準備が完了したら、次のウィンドウの **OK** をクリックしてください。Bravo デッキの 4 番の温度がセットされている 66℃に達していない場合、66℃に達するまでプロトコルは待機状態となります。



# CAUTION

次の Step24 を素早くかつ注意深く行うことがとても重要です。サンプルの温度が 65°Cを維持するように、サンプルプレートをサーマルサイクラから Bravo デッキに素早く移動させてください。サンプル溶液がはねないように、プレートを傾けたり急に持ち上げたりせず注意深くプレートからシールをはがします。サンプルプレートを Bravo デッキに移動させる前に、Agilent NGS 自動化システムのプラットフォームデッキの温度設定と、チップやプレートの設置が完全に完了したことを確認してください。

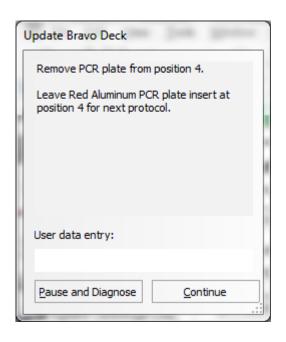
25. Vworks 画面に次のメッセージが表示されたら、PCR プレートをサーマルサイクラから素早く取り出します。このとき、サーマルサイクラ内の PCR プレートはハイブリダイゼーション反応終了後、65°Cで Hold の状態になっています。サンプル溶液がはねないように注意深くプレートシールをはがし、素早く Bravo デッキの 4 番に設置された赤いアルミニウムインサートの上に移動させます。PCR プレートを移動させた後、Continue をクリックします。



WARNING

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

26. Vworks 画面に次のメッセージが表示されたら、赤いアルミニウムインサートは残したままで、Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを取りはずします。Continue をクリックし、プロトコルを再開します。



SureSelectQXT\_Capture&Wash\_v1.0.rst の実行には約 90 分かかります。プログラムの終了後、Streptavidin 磁性ビーズにキャプチャされた DNA サンプルは Brovo デッキ 9 番の Eppendorf プレートに入っています。

ラン終了後、Brovo デッキ 9番から Eppendorf プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165℃、1.0 秒です。次の自動化プログラムで使用するまで氷上で保管してください。

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。



# 5. Index 付加とマルチプレックスシーケンスのため のサンプル準備

STEP1.	キャプチャライブラリの増幅と Index バーコードタグの付加	92
STEP2.	AMPure XP ビーズを用いた Index 付加ライブラリの精製	101
STEP3.	Index を付加した DNA サンプルの品質評価	105
STEP4.	定量 PCR による Index タグ付きキャプチャライブラリの定量(オプション)	
		109
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	110
STEP6.	シーケンスサンプルの準備	111
STFP7	Sequencing ランのセットアップと Read からのアダプタートリミング	115

この章では、増幅過程でインデックスを付加するステップとインデックスを付加したライブラリの精製とその品質と収量の評価をするステップについて記述します。また、マルチプレックスシーケンシングのためのインデックス付加ライブラリのプールの方法とシーケンシングステップにおけるガイドラインを記載します。

# STEP1 キャプチャライブラリの増幅と Index タグの付加

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムを用いて SureSelect で濃縮した DNA サンプルに Index タグをオンビーズ PCR で付加するステップを実行します。Agilent NGS 自動化システムのプロトコルは「Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro.」を使用します。

PCR プレートを調製した後、増幅のためにプレートをサーマルサイクラに移す必要があります。

このステップでは、表 46の試薬を使用します。試薬は解凍後、ボルテックスし、氷上に置いてください。

#### 表 46 PCR 増幅によるキャプチャ後の Index タグの付加に用いる試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 93
Herculase II 5× Reaction Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 93
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 93
SureSelect QXT P7 and P5 dual indexing primers	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	page 94

#### ワークステーションの準備

- 1. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーには少なくとも 300 mL の 25%エタノールが入っていることを確認してください。
- 2. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けてください。
- 3. Bravo デッキ 4 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4 °C に設定します。

Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照してください)。 Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。 さらに Bravo デッキ 6 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4 °C に設定します。 Bravo デッキ 6 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。

4. 赤の PCR プレートインサートを Bravo デッキ 6 番にセットします。

#### PCR マスターミックスの調製

# 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 フード中で陽圧の環境下で実施してください。

5. 表 47 にしたがって適切な量の PCR マスターミックスを調製してください。ボルテックスミキサで混合し、氷上におきます。

表 47 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の PCR マスターミックスの調製

SureSelect <sup>QXT</sup> Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	9.5 µl	121.1 µl	201.9 µl	282.6 µl	363.4 µl	524.9 µl	1049.8 μΙ
Herculase II 5× Reaction Buffer	10.0 μL	127.5 µl	212.5 µІ	297.5 µl	382.5 µІ	552.5 µl	1105.0 µІ
100 mM dNTP Mix	0.5 μL	6.4 µl	10.6 μΙ	14.9 μΙ	19.1 µl	27.6 µl	55.3 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1.0 µl	12.8 µІ	21.3 µІ	29.8 µІ	38.3 µІ	55.3 µI	110.5 µl
Total Volume	21.0 µl	267.8 μΙ	446.3 µl	624.8 µl	803.3 µI	1160.3 μΙ	2320.6 μΙ

6. 表 48 に示された量の PCR マスターミックスを、Hybridization\_QXT\_v1.0.pro プロトコルで用いた Nunc DeepWell マスターミックスソースプレートのカラム4のすべてのウェルに加えます。分注後の プレートは次のステップ(95 ページ)で使用するまで氷上においてください。

表 48 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の post-capture PCR ソースプレートの準備

	Position on	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate						
	Source Plate	1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs	
PCR Master Mix	Column 4 (A4-H4)	30.8 µІ	53.2 µl	75.5 µl	97.8 µl	142.4 μΙ	287.4 µІ	



post-capture PCR ソースプレートを新しい Deep Well プレートで作成される場合は、カラム1、2、3を空にしたまま PCR マスターミックスをカラム 4 に加えてください。

#### Index プライマーの割り当ての決定

- 7. 各サンプルに付加する適切な Index 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 Index 部分の塩基配列については、本書のリファレンス項を参照して下さい。(HiSeq もしくは MiSeq のプラットフォームでシークエンスを行う場合は表 71 と表 72、 NextSeq のプラットフォームの場合は表 71 と表 73 にしたがってください。)
  - dual index の割り当てについては下記のガイドラインにしたがってください。
  - 同じレーンでシークエンスを行う予定のサンプルには、異なる Index プライマーの組み合わせを採用してください。
  - ターゲット濃縮 DNA ライブラリープレートでは、同じ行のサンプルはすべて同じ P5 Index (P5 i13 から P5 i20) が割り当てられます。これは、自動化プロトコルを使用する場合、P5 Index プライマーは source plate の 1 つのカラムから PCR indexing プレートのすべてのカラムに分注されるためです。各行には、ランに要求されるデータ量やマルチプレックスの必要性を考慮して、同じ、もしくは異なる P5 プライマーを配置します (マスターミックス source plate に P5 Index プライマーを加える際の詳細は下の Step 10 にしたがってください)。
  - 自動化プロトコルでは、P7 indexing プライマー (P7 i1 から P7 i12)はターゲット濃縮 DNA ライブラリープレートのどのサンプルポジションでも配置できます (P7 プライマーsource plate のセットアップの詳細は下の Step 8、Step 9 にしたがってください)。
  - マルチプレックスシーケンスをする場合には、カラーバランスを保つため、P5 プライマーおよび P7 プライマー両方の Index の多様性を最大にすることを推奨しています。例えば、8 プレックスで行う場合では、異なる 8 つの P7 Index プライマーと 2 つの P5 Index プライマーを使用します。詳細はp.125 の表 74 にしたがってください。

# 3 カラムランで 8 サンプルをマルチプレックスする例

	1	2	3	4	5	6	•••
Α	P5 i13 / P7 i1	P5 i13 / P7 i1	P5 i13 / P7 i1				
В	P5 i13 / P7 i2	P5 i13 / P7 i2	P5 i13 / P7 i2				
С	P5 i13 / P7 i3	P5 i13 / P7 i3	P5 i13 / P7 i3				
D	P5 i13 / P7 i4	P5 i13 / P7 i4	P5 i13 / P7 i4				
E	P5 i14 / P7 i5	P5 i14 / P7 i5	P5 i14 / P7 i5				
F	P5 i14 / P7 i6	P5 i14 / P7 i6	P5 i14 / P7 i6				
G	P5 i14 / P7 i7	P5 i14 / P7 i7	P5 i14 / P7 i7				
Н	P5 i14 / P7 i8	P5 i14 / P7 i8	P5 i14 / P7 i8				

#### 3 カラムランで全サンプルに対して異なる組み合わせのインデックスを付ける例

	1	2	3	4	5	6	•••
Α	P5 i13 / P7 i1	P5 i13 / P7 i2	P5 i13 / P7 i3				
В	P5 i13 / P7 i4	P5 i13 / P7 i5	P5 i13 / P7 i6				
С	P5 i13 / P7 i7	P5 i13 / P7 i8	P5 i13 / P7 i9				
D	P5 i14 / P7 i1	P5 i14 / P7 i2	P5 i14 / P7 i3				
E	P5 i14 / P7 i4	P5 i14 / P7 i5	P5 i14 / P7 i6				
F	P5 i14 / P7 i7	P5 i14 / P7 i8	P5 i14 / P7 i9				
G	P5 i15 / <b>P7 i1</b>	P5 i15 / P7 i2	P5 i15 / P7 i3				
Н	P5 i15 / P7 i4	P5 i15 / P7 i5	P5 i15 / P7 i6				

8. 各 P7 indexing プライマー (P7 i1 から P7 i12)を表 49 にしたがって希釈します。下記の容量は計量のロス分を含んでいます。

表 49 P7 indexing プライマーの希釈溶液の準備

Reagent	Volume to Index 1 Sample	Volume to Index 8 Samples
Nuclease-free water	4.0 μΙ	34 μΙ
SureSelect QXT P7 dual indexing primer (P7 i1 to P7 i12)	1.0 µl	8.5 µІ
Total Volume	5.0 µl	42.5 μΙ

9. 新しい PCR プレートの各 P7 indexing プライマーを配置する予定のウェルに、表 49 のとおりに 希釈した P7 indexing プライマーを  $5 \mu L$  ずつ分注します。

分注したプレートは氷上においてください。

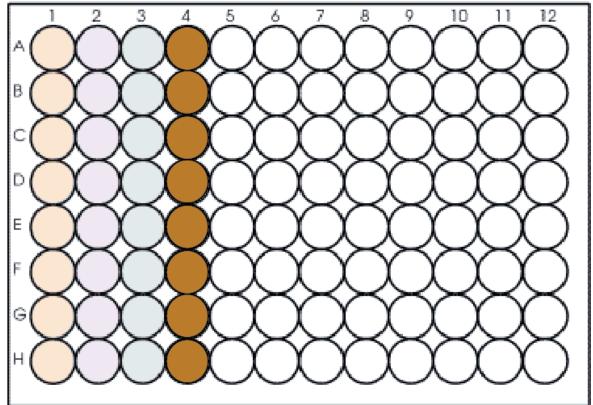
10. 上の Step 6 で準備した、PCR マスターミックスをカラム 4 に分注した Nunc DeepWell マスターミックスソースプレートを用意します。各 P5 Index プライマー(P5 i13 から P5 i20)をカラム 4 の適切なウェル中のマスターミックスに加えてください。このとき、ランに使用するサンプルカラム数によって、表 50 に記載されている量を加えます。カラム 4 の各ウェルには同じ、もしくは異なる P5 Index プライマーを加えることができます。マスターミックスソースプレートの最終的な配置は p.97の図 11 にしたがってください。

分注したソースプレートは氷上においてください。

# 表 50 post-capture PCR ソースプレートに分注する P5 Index プライマー量

Solution added to Source Plate	Position on Source Plate	Volume of Primer added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
SureSelect QXT P5 dual indexing primer(s)*	Column 4 (A4-H4)	1.5 µІ	2.5 µl	3.6 µІ	4.7 µІ	6.8 µІ	13.7 µІ

<sup>\*</sup>カラム 4 の各ウェルには、同じ、もしくは異なる P5 Index プライマーを配置することができます。 典型的な 12 カラムのランでは SureSelectQXT P5 dual indexing プライマー (P5 i13 から P5 i20)の 8 つすべてを使用し、PCR indexing プレートの各行に異なる P5 プライマーが配置されます。



B 11 Post-Cant

# 図 11 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro.で用いるマスターミックスソースプレートの配置

- 11. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は、165° C、1.0 秒です。
- 12. プレートをボルテックスでよく混合してください。30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とし、気泡を除きます。

#### NGS ワークステーションの準備

13. 表 51 にしたがって Labware MiniHub を準備します。プレートの配置は p.21 の図 2 にしたがってください。

表 51 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の Labware MiniHub の初期配置

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

14. 表 52 にしたがって Bravo デッキを準備してください。

表 52 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Captured DNA bead suspensions in Eppendorf twin.tec plate
6	Diluted P7 indexing primers in PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
9	Master mix plate containing P5 indexing primers and PCR Master Mix in Column 4 (unsealed)

15. 表 53 にしたがってチップボックスを BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 53 Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro 用の BenchCel の初期配置

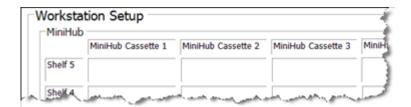
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
3	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
4	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
6	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
12	1 Tip box	Empty	Empty	Empty

# VWorks プロトコル Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro の実行

- 16. SureSelect セットアップフォームの Select Protocol to Run の下の Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro を選択します。
- 17. Select PCR plate labware for Thermal Cycling の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 6 番に乗せる PCR プレートのタイプを選択します。
- 18. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 19. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



20. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。



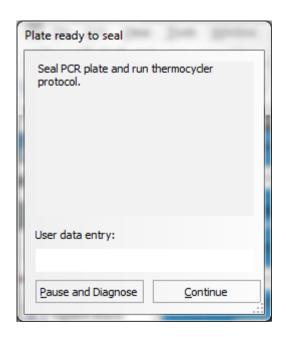
21. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

22. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



Post-CapturePCR\_QXT\_ILM\_v1.0.pro の実行には、約 15 分かかります。実行後、キャプチャされた DNA と PCR マスターミックスを含む PCR-ready サンプルは Bravo デッキの 6 番の PCR プレートに準備されています。

次のメッセージが VWorks 画面上に表示されたら、Bravo デッキ 6 番から PCR プレートを取り、 PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は、165° C、3.0 秒です。



23. PCR プレートは 30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とし、気泡を除きます。

24. PCR プレートをサーマルサイクラに移し、表 54 のプログラムで増幅します。

表 54 Post-Capture PCR サイクルプログラム

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 Capture Libraries <1 Mb: 14 Cycles	58°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	4°C	Hold

# STEP2 AMPure XP ビーズを用いた Index 付加ライブラリの精製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムを用いて、Index を付加した DNA サンプルのプレートに AMPure XP ビーズを分注して攪拌し、ビーズに結合した DNA を洗浄、溶出する操作を実行します。

#### ワークステーションと試薬の準備

- 1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
- 2. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
- 3. 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。 AMPure XPビーズは決して冷凍保存しないでください。
- 4. ビーズ懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- 5. 赤の PCR プレートインサートを Bravo デッキ 9番にセットします。
- 6. チラー(ThermoCube)の電源を入れ、4°Cにセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
- 7. Bravo デッキ 4 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 45 °Cに設定します (Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照してください)。 Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
- 8. AMPure XPビーズ懸濁液の入った Nunc DeepWell ソースプレートを準備します。均一な状態にした AMPure XPビーズ懸濁液 65 µL を、Nunc DeepWell プレートの使用する各ウェルに入れます。
- 9. 15 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
- 10. 45 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。リザーバーの側面に nuclease-free 水と区別がつくように印をつけることをお勧めします。
- 11. PCR プレートは 30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。

12. 表 55 にしたがって Labware MiniHub を準備します。プレートの配置は p.21 の図 2 にしたがってください。

表 55 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Post-Capture PCR 用の Labware MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty Nunc DeepWell plate	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf Plate	Empty	Empty
Shelf 2	Empty	Nuclease-free water reservoir from step 8	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 7	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Empty	70% ethanol reservoir from step 9	Empty	Empty tip box

13. 表 56 にしたがって Bravo デッキを準備してください。

表 56 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Post-Capture PCR 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
9	Indexed library samples in unsealed PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

14. 表 57 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation を準備してください。

表 57 AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Post-Capture PCR 用の BenchCel の初期配置

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

# VWorks プロトコル AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Post-Capture PCR の実行

15. SureSelect セットアップフォームの Select Protocol to Run の下の AMPureXP\_QXT\_ILM\_v1.0.pro:Post-Capture PCR を選択します。

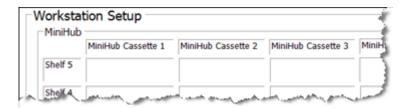
# NOTE

AMPureXP 精製プロトコルは SureSelect の自動化ワークフローで複数回使用します。プロトコルもそれぞれ異なりますので、自動化プロトコルを開始するときには必ず正しいプロトコルを選択するようにしてください。

- 16. Select PCR plate labware for Thermal Cycling の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 9番の Index 付加したライブラリの入った PCR プレートのタイプを選択します。
- 17. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
- 18. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



19. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。



- 20. ミニハブの電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。
- 21. 確認後 Run Selected Protocol をクリックしてください。



この精製プロトコルには、約 45 分かかります。実行後、増幅された DNA サンプルは Bravo デッキの 7番のエッペンドルフプレートに準備されています。

#### STEP3 Index を付加した DNA サンプルの品質評価

### Option 1: Agilent 2100 バイオアナライザによる品質(サイズ)チェック

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 試薬キットを用いて測定します。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。

# NOTE

High Sensitivity DNA アッセイには Version B.02.07 以上の Agilent 2100 Expert ソフトウェアが必要です。

- 1. Agilent 2100 expert ソフトウェアを起動し、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。
- 2. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
- 3. 各ウェルのサンプルを均一にするためプレートをボルテックスした後、30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。
- 4. 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。分析には各サンプル にあたり 1 µL ずつ使用します。

# 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 1xTE を 9 $\mu$ L 加えて 10 倍に希釈し、塩を含んだ状態にすることをお勧めしています。 付属のボルテックスミキサ (IKA vortex)を用いて 2000 rpm でよく混合した後、その希釈液から 1  $\mu$ L とって測定してください。 希釈倍率は濃度の計算に必要となりますので、必ず記録をとってください。

- 5. 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。
- 6. 結果をチェックします。図 12 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。

**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 で一晩保存できます。1日より長く保存する場合は-20°C で保存してください。

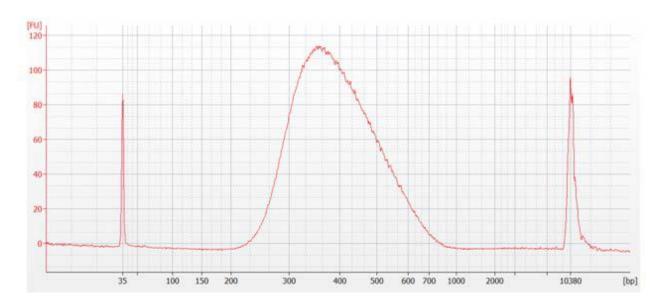


図 12 High Sensitivity DNA キットを用いた Index を付加した DNA サンプルの泳動結果

# Option 2: Agilent TapeStation による品質(サイズ)チェック

TapeStation の High Sensitivity D1000 ScreenTape (p/n 5067-5584)と専用試薬キット(p/n 5067-5585)を使います。TapeStation の操作マニュアルは下記 Web サイトからダウンロードしていただけます。

#### 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. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
- 2. 各ウェルのサンプルを均一にするためプレートを 5 秒ボルテックスした後、30 秒間遠心して壁や プレートシールについた液を落とします。
- 3. Agilent TapeStation の操作マニュアルに従い、2 uL のアダプター付き増幅 DNA サンプルを、2 uL の High Sensitivity D1000 サンプルバッファで希釈し、よく混ぜます。

# 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5秒間、確実に混合して下さい。

- 4. Agilent TapeStation User Manual を参照して、Step3 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 TapeStation にセットします。ランを開始します。
- 5. 結果をチェックします。図 13 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。

**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 で一晩保存できます。1日より長く保存する場合は-20°C で保存してください。

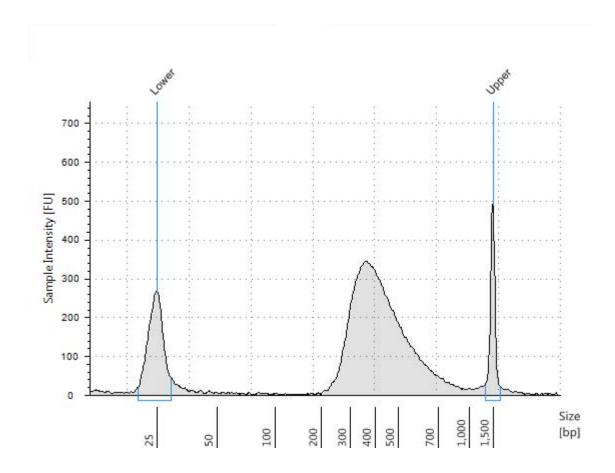


図 13 2200TapeStation を用いた Index を付加した DNA サンプルの泳動結果

### STEP4 定量 PCR による Index 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)のプロトコルを必ず参照ください。

- 1. Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (p/n G4880A イルミナ用)を、各 Index タグ付き キャプチャライブラリの定量に用います。
- 2. 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。
- 3. 各 Index 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。
- 4. 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。
- 5. 各 PCR チューブ(プレート)に、master mix を分注し、template を加えます。
- 6. 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。
- 7. 検量線からそれぞれの Index 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

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正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、Index 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。

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

V(f): プールするための最終的な必要量

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 Index バーコードタグの数

C(i): 各 Index サンプルの初期濃度

表 58 トータル量 20uL にするための Index タグ付きサンプルの混合例

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

- 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 Index タグ付き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 Index 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。
- 3. 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 シーケンスサンプルの準備

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、HiSeg および MiSeg で

は 8 pM から 12 pM の間、NextSeq では 1.2 pM から 1.4 pM の間です。Seeding 濃度とクラスタ密度は、ライブラリの DNA 断片サイズ分布や、求める出力内容とデータの質に応じて調整する必要がある場合があります。Sequencing のクオリティコントロールのために、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。

### NOTE

Seeding 推奨濃度(8 pM から 12 pM)は 2100 バイオアナライザ、もしくは TapeStation を使用して定量しています。p.105 から p.108 を参照してください。

QPCR など異なる定量方法を実施する場合は、最適なクラスタ密度にするための Seeding 濃度を検討する必要がある場合があります。

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。表 59 のキットの構成品は推奨する Read 長に対応しています。Read 長には SureSelect QXT 8 bp dual index に必要な Read 長 (計 16 bp) を加えてください。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 59 イルミナ Cluster Generation キット 選択ガイド

Platform	Run Type	Read Length <sup>*</sup>	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 x 50 Cycle Kit <sup>†</sup>	v3
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4 x 50 Cycle Kit <sup>†</sup>	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

<sup>\*</sup> アプリケーション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。

<sup>† 200</sup> 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。

# 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 Sequenicng 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 perimer は 100 µM 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 で希釈をする必要があります。

**HiSeq プラットフォーム**では p.114 の表 60 もしくは表 61 に示す通りプライマーを組み合わせて下さい。 **MiSeq プラットフォーム**では p.114 の表 62 に示す通りプライマーを組み合わせて下さい。

**NextSeq プラットフォーム**では p.115 の表 63 もしくは表 64 に示す通りプライマーを組み合わせて下さい。

### 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十分に混合し、custom read primer で Index 検出が正しく行われるよう、溶液を完全に均一にして下さい。

## 表 60 HiSeq 2000と HiSeq 2500 High Output モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect <sup>QXT</sup> Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	5 µl SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	995 µl HP6 or HP10	1 ml <sup>*</sup>
Index	15 µl SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	2985 μl HP8 or HP12	3 ml
Read 2	15 µl SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	2985 μl HP7 or HP11	3 ml

## 表 61 HiSeq 2500 Rapid モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect <sup>QXT</sup> 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 µI HP11	1.75 ml

## 表 62 MiSeq プラットフォームの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect <sup>OXT</sup> 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

## 表 63 NextSeq 500 / 550 High-Output v2 Kit の Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect <sup>OXT</sup> 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 64 NextSeq 500 / 550 Mid-Output v2 Kit の Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect <sup>OXT</sup> 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 ランのセットアップと Read からのアダプタートリミング

Custom sequencing primer を使った Sequencing ラン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ください。

SureSelect QXT dual index の配列情報は p.123 の表 71 にしたがってください。

### 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えます。

SureCall page at www.genomics.agilent.com

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.117 の図 14 にしたがってください。SureCall を起動し Analysis Workflow タブをクリックしてください。適切な Analysis Type(single sample/pair analysis/trio analysis)を選択し、Import Unaligned Files ボタンをクリックしてください。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ください。画面 下方の Analysis Method メニューから Default SureSelect QXT Method を選択し、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 の説明書をご参照ください。

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、p.117 からのプラットフォームごとのガイドラインにしたがってください。

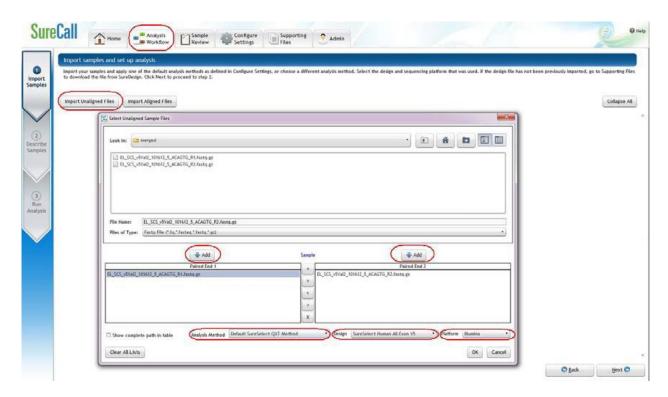


図 14 SureCall の Analysis Workflow の作成

### 解析に SureCall を使用しない場合

● MiSeg 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 を作成してください。Read 1, Read 2, Index の Custom Primer にチェックをいれます。

IEM Sample Sheet Wizard を用いて、アダプタートリミングを含むランの設定を行ってください。Wizard で画面に指示が出た際に、Use Adaptor Trimming オプションを選択し、アダプター配列として CTGTCTCTTGATCACA と指定してください。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。

● HiSeq、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

表 65 を参照して Sequencing ランの設定を行ってください。HiSeq でのランでは、Instrument control ソフトウェアの Run Configuration 画面で Dual Index を選択します。QXT Custom Primer は標準的なイルミナ社の Sequencing primer のチューブに添加されています。ランを行う際に QXT Custom Primer を使用するための特別な設定は不要です。

NextSeq でのランでは、サイクル数とカスタムシーケンシングプライマーセッティングを Instrument control ソフトウェアの Run Configuration 画面で設定します。

表 65 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 ランの終了後、イルミナ社の取り扱い説明にしたがって 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&tabld=prod2570007



試薬一覧 試薬キット構成品	92
SureSelect QXT Dual Index の塩基配列	101
Dual Index 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン	105

この章では、リファレンス情報としてキットの構成品とサンプル Sequencing ステップで利用する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 66 SureSelect QXT 試薬キット 構成品一覧

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

<sup>\*</sup>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 66 の各構成品の内容は以下の表 67、表 68、表 69 に記載されています。

## 6. リファレンス

## 表 67 SureSelect QXT Library Prep ILM, Box 2 の構成品

Kit Component	HiSeq or MiSeq (ILM) 96 Reactions
SureSelect QXT Buffer	bottle
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	tube with orange cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
Herculase II 5× Reaction Buffer	tube with clear cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap
DMS0	tube with green cap
SureSelect QXT Read Primer 1	tube with amber cap
SureSelect QXT Read Primer 2	tube with black cap
SureSelect QXT Index Read Primer	tube with clear cap
SureSelect QXT P7 dual indexing primers	P7 i1 through P7 i12 provided in 12 tubes with yellow caps (one tube per primer)
SureSelect QXT P5 dual indexing primers	P5 i13 through P5 i20 provided in 8 tubes with blue caps (one tube per primer)

## 表 68 SureSelect QXT Library Prep NSQ, Box 2 の構成品

Kit Component	NextSeq (NSQ) 96 Reactions
Kit Component	Nextseq (Not) 90 heactions
SureSelect QXT Buffer	bottle
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	tube with orange cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
Herculase II 5× Reaction Buffer	tube with clear cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap
DMS0	tube with green cap
SureSelect QXT Read Primer 1	tube with amber cap
SureSelect QXT Read Primer 2	tube with black cap
SureSelect QXT Index Read Primer	tube with clear cap
SureSelect QXT Index 2 Read Primer NSQ	tube with purple cap
SureSelect QXT P7 dual indexing primers	P7 i1 through P7 i12 provided in 12 tubes with yellow caps (one tube per primer)
SureSelect QXT P5 dual indexing primers	P5 i13 through P5 i20 provided in 8 tubes with blue caps (one tube per primer)

## 表 69 SureSelect QXT Hyb Module Box 1 の構成品

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

## 表 70 SureSelect QXT Hyb Module Box 2 の構成品

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

### 6. リファレンス

## SureSelect QXT Dual Index の塩基配列

SureSelect QXT Index の塩基配列を次の表に示します。

SureSelect QXT P5、P7 Index の Index Number は、イルミナ社が使用するインデックス配列と類似、あるいは同じ配列であっても Index Number が異なるものがあります。

各 Index は 8 ベースの長さです。8 ベースの Index 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社の取り扱い説明にしたがってください。

表 71 SureSelect QXT P7 index (1 から 12)

TAAGGCGA
CGTACTAG
AGGCAGAA
TCCTGAGC
GTAGAGGA
TAGGCATG
CTCTCTAC
CAGAGAGG
GCTACGCT
CGAGGCTG
AAGAGGCA
GGACTCCT

表 72 BaseSpace を利用して HiSeq、MiSeq もしくは NextSeq プラットフォームでのランを実施する際の SureSelect QXT P5 Index 配列情報 (13 から 20)

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

# 表 73 BaseSpace を利用せずに NextSeq プラットフォームでのランを実施する際の SureSelect QXT P5 Index 配列情報 (13 から 20)\*

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

<sup>\*</sup>BaseSpace を利用する場合は表 72 に記載されている reverse complement な配列を使用してください。

#### 6. リファレンス

## 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、表 74 に記載している Index の組み合わせを推奨しています。この組み合わせは、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決定されています。少ないサンプルをプールした実験において、Single index もしくは Dual Index を付加したサンプルとして Demultiplexing する場合に対応しています。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ください。

表 74 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 <sup>QXT</sup> P7 Indexes	Recommended SureSelect <sup>QXT</sup> 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 <sup>*</sup> and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4, P7 i5 <sup>*</sup> and P7 i6 OR P7 i5, P7 i6 <sup>*</sup> , 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)

<sup>\*</sup> このマークで示された Index は、プールされるほかのサンプルと異なる Index 配列を持つものであれば、P7 i1 から P7 i11 の中の他の Index で置き換えることも可能です。

Copyright Agilent Technologies 2014-2016

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版権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

### ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、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写、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。複写、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 QXT 自動化システムに関するサポート お問い合わせ窓口

TEL: 0120-477-111

E-mail: email japan@agilent.com

- \* SureSelect QXT 自動化システムに関する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。