



アジレント SureSelect XT **Low Input** (ポストプール)

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

和文プロトコル

Protocol

Version B0. 対応

[2018 年 3 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 Procedure.



Agilent Technologies

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^{XT} Low Input Automated Target Enrichment
for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing
Version B0., January 2018
G9703-90010
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 XT Low Input キットを用い、ゲノムの中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ビオチン化 RNA オリゴマーライブラリ (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 SureSelect XT Low Input 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、SureSelect 新製品体系の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 XT Low Input キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。その他の SureSelect キットを使用する場合やマニュアルで調製する場合は、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

1 はじめに

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

2 Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

この章では、Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムの紹介、SureSelect Target Enrichment のプロトコルの概要、および SureSelect の実験をデザインする際の Agilent SureSelect XT Low Input 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 サンプルの調製

この章では、ターゲット領域の濃縮に用いるライブラリの調製法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、調製した DNA ライブラリに SureSelect や ClearSeq オリゴキャプチャライブラリをハイブリダイゼーションし、キャプチャする手順について説明しています。

5 マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

この章では、キャプチャ後のサンプル増幅工程とシーケンスするサンプル調製のガイドラインについて説明しています。

6 Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用

この章では、FFPE 由来 DNA サンプルに対する推奨するプロトコルの変更内容について説明しています。

7 リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬キットの構成成分、インデックス配列やトラブルシューティングガイドなどの参照情報を記載しています。

Version B0 での変更点

- LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst の Bravo 初期配置について、シルバーインサートなしで Nunc DeepWell ソースプレートを設置するよう修正しました (p. 47 表 20)。
- 6 または 12 カラムでランする場合の Master Mix ソースプレートの容量をアップデートしました (p. 44 表 18、p.53 表 26)。
- Bravo デッキ 9 を室温に戻すため、チラーの電源を切るステップを追加しました (p. 62、p. 105 の step 3)。

目次

1. はじめに.....	7
操作に関する注意.....	8
安全に関する注意.....	10
実験に必要な試薬.....	11
実験に必要な装置、消耗品類.....	13
実験に必要な装置、消耗品類オプション.....	14
2. Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment.....	15
Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システム.....	15
Bravo プラットフォームについて.....	16
BenchCel について.....	17
MiniHub について.....	17
PlateLoc について.....	18
Bravo デッキヒートブロックの温度設定.....	19
チラーの温度設定.....	21
VWorks Automation Control ソフトウェア.....	22
Bravo の初期化.....	25
SureSelect Target Enrichment Procedure の概要.....	28
自動化ランを行う上での実験条件の検討.....	31
3. サンプルの調製.....	35
STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認.....	36
STEP2. DNA の断片化.....	39
STEP3. アダプター付加ライブラリの調製.....	41
STEP4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅.....	50
STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅した DNA の精製.....	58
STEP6. ライブラリ DNA のサイズチェックと定量.....	62
4. ハイブリダイゼーション.....	70
STEP1. ハイブリダイゼーションのための調製済み DNA サンプルの分取.....	71
STEP2. DNA ライブラリとキャプチャライブラリのハイブリダイゼーション.....	75
STEP3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャと洗浄.....	88
5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製.....	95
STEP1. キャプチャライブラリの増幅.....	96
STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅したキャプチャ後ライブラリの精製.....	102
STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認.....	105
STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール.....	114
STEP5. シーケンスサンプルの調製.....	116
STEP6. シーケンスの開始とデータ解析.....	118

6. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用	123
FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更	124
FFPE サンプルの品質確認	124
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	125
7. リファレンス	126
キット内容	126
SureSelect XT Low Input インデックスの塩基配列	130
トラブルシューティングガイド	132



1. はじめに

操作に関する注意	8
安全に関する注意	10
実験に必要な試薬	11
実験に必要な装置、消耗品類	13
実験に必要な装置、消耗品類オプション	14

最新のプロトコルを参照にしてください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

本プロトコルは Agilent の SureSelect XT Low Input 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 XT Low Input Target Enrichment Kit (イルミナマルチプレックスシーケンシング対応) 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 (G9730-90000 の和訳版) を参照ください。

NOTE

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

NOTE

本 SureSelect XT Low Input 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ライブラリ作製プロトコルと異なる点がありますのでご注意ください。

NOTE

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



NOTE

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

操作に関する注意

<<重要>>

遠心の際にシールを貼ったプレートについては、特にシールを貼ったままという記載のない限り、Bravo やミニハブのデッキにプレート进行載せる際に、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 SureSelect XT Low Input 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 SureSelect XT Low Input 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 p. 46 の図 4 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。
- ・ 赤いアルミニウムインサートにプレートをセットする場合やシルバーの Nunc 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。

- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物のコンタミネーションを防ぐため、以下を実施することをお勧めします。
 1. PCR 前のサンプルを扱う場所と PCR 後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用してください。特に、PCR 後のエリアで使用するものを PCR 前の過程で使用するのは避けてください。
 2. 実験スペースは常にクリーンな状態にしてください。PCR 前の過程では作業台を 10% bleach solution やその相当品により、日常的に清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタつきのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ プロトコル中に示されている stopping point でサンプルを-20℃ で保存する場合は、サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。
- ・ Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

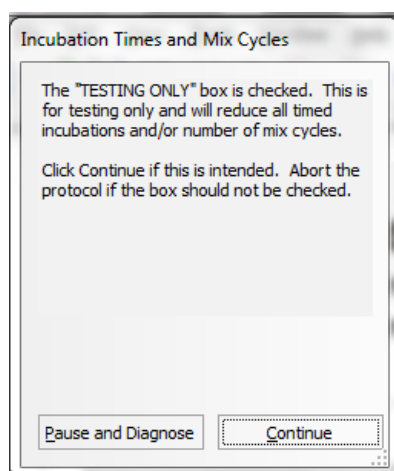
1. はじめに

- ・ 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ています。Form 画面の一番右下に次の画面があります。

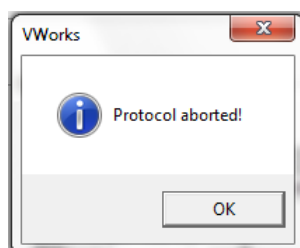
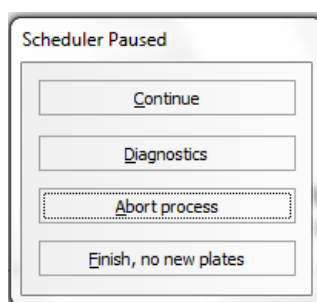
Advanced Settings

☐ TESTING ONLY: Reduces all incubation times and/or mix cycles

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。



安全に関する注意

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 必要な試薬(全サンプルタイプ)

SureSelect XT Low Input 試薬キット					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
SureSelect XT Low Input Reagents (index 1-96)*, イルミナ, 96 反応†	Agilent	G9703A	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
SureSelect XT Low Input Reagents (index 97-192)*, イルミナ, 96 反応†	Agilent	G9703B	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)

* HiSeq, MiSeq, NextSeq500プラットフォームに対応

† 96 反応のキットには1ランあたりに24サンプルを含めた場合の4ラン分に相当する量が含まれます。

品名	製造メーカー	96反応分
SureSelect XT キャプチャライブラリ (ベイト)		
SureSelect XT Human All Exon V6	Agilent	5190-8864
SureSelect XT Human All Exon V6 + UTRs	Agilent	5190-8882
SureSelect XT Human All Exon V6 + COSMIC	Agilent	5190-9308
SureSelect XT Human All Exon V5	Agilent	5190-6209
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs	Agilent	5190-6214
SureSelect XT Human All Exon V5+IncRNA	Agilent	5190-6447
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory	Agilent	931072
SureSelect XT Focused Exome	Agilent	5190-7788
SureSelect XT Clinical Research Exome	Agilent	5190-7339
SureSelect XT Clinical Research Exome V2	Agilent	5190-9492
SureSelect XT Mouse All Exon	Agilent	5190-4642
SureSelect XT Mouse All Exon V2 (mm10 対応)	Agilent	EA
SureSelect XT NCC oncopanel	Agilent	931196
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb	Agilent	5190-4807
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 再発注	Agilent	5190-4812
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb	Agilent	5190-4817
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4822
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb	Agilent	5190-4827
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4832
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb	Agilent	5190-4837
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4842
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb	Agilent	5190-4897
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb, 再発注	Agilent	5190-4902
ClearSeq キャプチャライブラリ (ベイト)		
ClearSeq SS Comprehensive Cancer	Agilent	5190-8012
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ	Agilent	5190-7519

EA : Early Access 品です。詳細はお問い合わせ下さい。

1. はじめに

その他の試薬(すべてのサンプルタイプ)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agencourt AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter Genomics	A63881 または A63882	指定	60 mL または 450 mL	
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	65602 または 65603	指定	10 mL または 100 mL	
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Ambion	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850	指定	100 assay	スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。 大容量タイプ(500 assays [Q32853]) もあります。
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32851	指定	100 assay	BR Assayでは感度が足りないgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。 大容量タイプ(500 assays [Q32854]) もあります。

表 2 必要な試薬(FFPE DNA サンプルのみ)

その他の試薬(FFPE DNAサンプルのみ)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)	指定	16反応分 または 96反応分	FFPE由来DNAサンプルの場合、 ゲノムDNA QCに使用します。
Genomic DNA Screen Tape	Agilent	5067-5365	指定	7枚	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 Samples	Qiagen	56404	指定		
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		

表 3 ライブラリ QC 用

ライブラリQC用(お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用もしくはバイオアナライザ用、いずれかの消耗品をご用意下さい。)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent 4200 / 2200 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	112サンプル分	自動化システムでサンプル調製を行う場合、 通常の2倍量使用します。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	112サンプル分	
96-well sample plate (4200 TapeStation専用)	Agilent	5042-8502	指定		2200 TapeStationには使用できません。 5067-5150 96-well sample plate を使用してください。
96-well plate foil seals	Agilent	5067-5154	指定		
8-well tube strips	Agilent	401428	指定		
8-well tube strip caps	Agilent	401425	指定		
Loading tips (4200 TapeStation専用)	Agilent	5067-5598	指定		2200 TapeStationには使用できません。 5067-5153 Loading tips を使用してください。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品					
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。

※大容量または小容量タイプがあるものはご利用いただけません。

実験に必要な装置、消耗品類

表 4 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
DNA解析用の電気泳動装置(いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。)					
Agilent 4200 TapeStation System	Agilent	G2991AA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Agilent 2200 TapeStationの使用も可能ですが、サンプル調製時の自動化システムは使用できません。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。
その他の装置					
サーマルサイクラ					Hot Top使用。 SureCycler8800サーマルサイクラ (Agilent p/n G800A), 96 well plate module (Agilent p/n G8810A), compression mats (Agilent p/n 410187) もしくは相当品
PCR plate					サーマルサイクラに適したプレートを選択してください。 自動化に対応しているプレートはp. 34、表 10 を参照してください。
Eppendorf twin.tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	95102000401	指定		951020619でも可
Thermo Scientific Reservoirs	Thermo Scientific	1064156	指定		
Nunc DeepWell Plates, sterile, 1.3 mL well volume	Thermo Scientific	260251	指定		
Axygen 96 Deep Well Plate, 2 mL, Square Well (waste reservoirs; working volume 2.2 mL)	Axygen	P-2ML-SQ-C	指定		E&K Scientific p/n EK-2440でも可
Robotic Pipetting Tips (Sterile, Filtered, 250 µL)	Agilent	19477-022	指定		1ケース96チップ入り、50ケース
Peelable Clear Seal for PlateLoc Sealer	Agilent	24210-001	指定		
DNA Away Surface Decontaminant Wipes	Thermo Scientific	7008	相当		自動化システムの清掃に使用します。
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q32857	指定		スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit assay tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856	指定		QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
DNA LoBind チューブ, 1.5mL PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用してください。
Covaris Sample Preparation System	Covaris (エムエス機器)	Model E220	指定		E220以外のモデルをご使用の場合は製造元にお問い合わせください。 ネブライザの使用は推奨しません。
Covaris microTUBE sample holders	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		
遠心分離機	Eppendorf	5804	相当		96 Well Plate対応タイプ、Deep Well (高さ31.35 mm) が入ること。1000 g以上。
濃縮遠心機 (96 well plate用ローター付き)	Savant	SC210A	相当		45℃以下の低温で96 Well Plateに入れた溶液 (最大 12 µL) が濃縮できること。 専用ロータ、冷却トラップと油回転真空ポンプが必要です。TOMY精工のCC-105一式も使用できます。 SavantのDNA120と96 Well Plate用のローター (RD2MP) も使用できますが、Deep Well Plateは入りません。
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12302D	相当		大容量のストレプトアビジンビーズを一度に洗浄するために必要です。48サンプル以下のサンプル数を扱う場合にはDynaL DynaMg-15 (12301D)が便利です。
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアロゾルブロックフィルター付き					
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当		
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当		
アイスバケツ					
タイマー					
ホルテックスミキサ					

gDNA をロスなく再現欲、かつ確実に 150-200 bp の長さに断片化するために、Covaris の使用が指定されています。Covaris の詳細については、エムエス機器株式会社にお問い合わせください。

1. はじめに

実験に必要な装置、消耗品類オプション

表 5 その他オプションの試薬・装置

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
高品質のgDNAを精製するシステム例: QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304	相当	50サンプル	250サンプル用もあります (p/n 51306)
Ethylene Glycol	Wako	055-00996	相当	500 mL	コバリスの冷却水循環溶液に、凍結防止のために添加します。
Tween 20	Sigma Aldrich	P9416-50ML	相当	50 mL	シーケンスライブラリの保存のために使用します。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	L12-20	相当		PCRの機種によっては、stripキャップのかわりにシールを使用できますが、液が蒸発しやすくなる場合があるので、十分な注意とテストが必要です。HotTop対応のものをお使いください。
AriaMx リアルタイム定量PCRシステム	Agilent	G8830A	相当		FFPE由来DNAサンプルの場合、ゲノムDNA QCに使用します。
AriaMx 96-well plates または optical Tube Strip	Agilent	401490 または 401493	相当		AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。
Mx3000p/Mx3005P Optical Strip caps	Agilent	401425	相当		AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

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

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

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存ください。

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

※自動化システムが使用する消耗品については、必ず指定の製品をご利用ください。指定の消耗品の使用を前提として、1 mm 以下の精度でプロトコルが組まれています。指定以外の製品を利用すると実験がうまくいなくなる危険性があります。



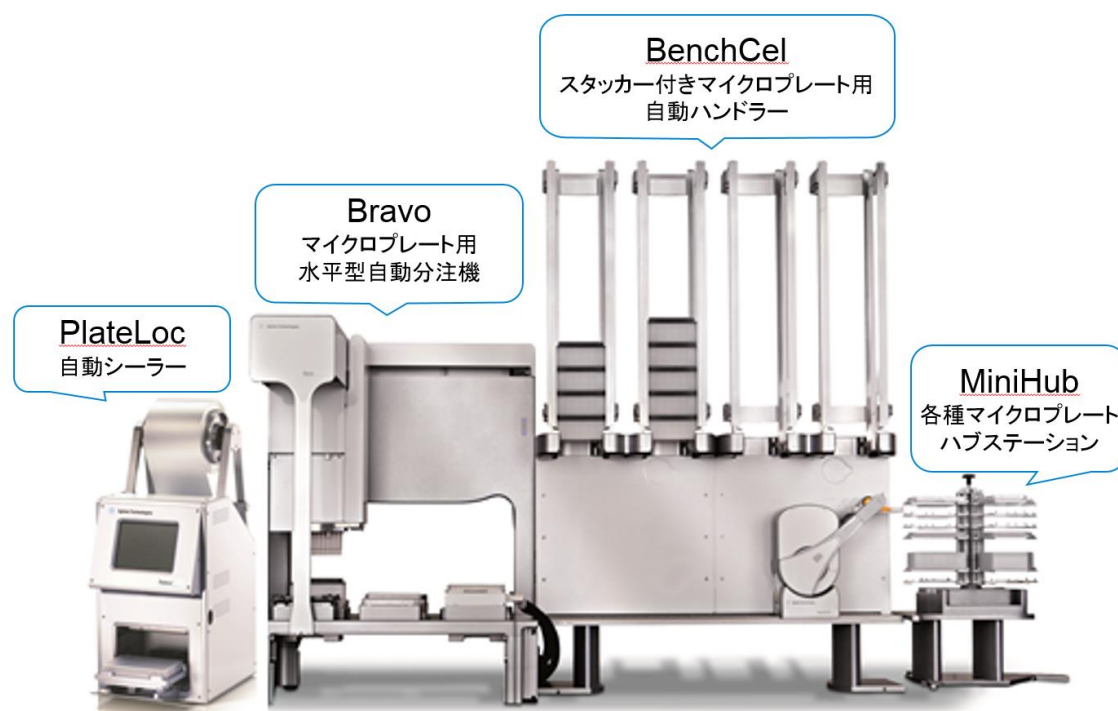
2. Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムを使用した SureSelect Target Enrichment

Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システム	15
SureSelect Target Enrichment Procedure の概要	28
自動化ランを行う上での実験条件の検討	31

この章では、Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムの紹介、SureSelect XT Low Input Target Enrichment のプロトコル概要、および Agilent SureSelect XT Low Input 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 SureSelect XT Low Input 自動化システム

Agilent SureSelect XT Low Input 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。



CAUTION

はじめに、ご使用の Bravo プラットフォームの操作、メンテナンス、および安全上の注意をよくお読みください。表 6 のユーザーガイドのリストを参照してください。

表 6 Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システム ユーザーガイド

Device	User Guide part number
Bravo Platform	G5562-90000
VWorks Software (version 11.3.0.1195)	G5415-90063
BenchCel Microplate Handler	G5400-90004
Labware MiniHub	G5471-90002
PlateLoc Thermal Microplate Sealer	G5402-90001

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。本プロトコルで使用しているピペットヘッドでは、2 μL から 175 μL までの液体を正確に分注できます。

Bravoプラットフォームデッキ

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



図 1 Bravo プラットフォームデッキ

BenchCelについて

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

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

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

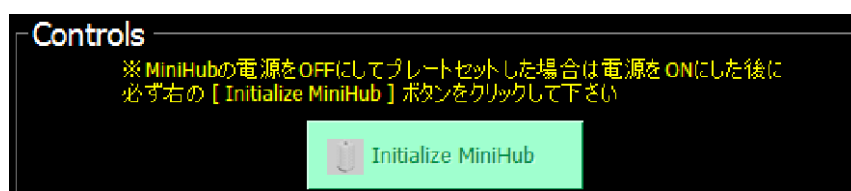
MiniHubについて

MiniHub にプレートセットする際には、いつも p. 46 の図 4 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。

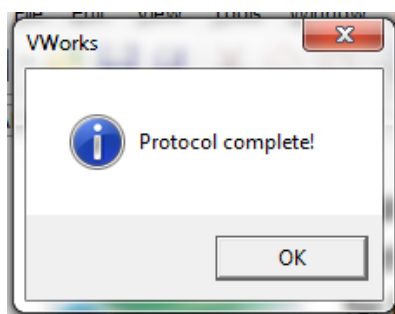
[MiniHub のイニシャライズボタン追加]

MiniHub の横や後ろにスペースがなく、MiniHub にプレートをセットしにくい場合、MiniHub の電源をいったん OFF にして、手動で MiniHub を回転させて必要なプレートをセットし、セットが終わった後に MiniHub の電源を再び ON にして、Initialize MiniHub ボタンを押してイニシャライズをかけることができます。



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

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



OK ボタンを押してから、次の操作を行ってください。

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

PlateLocについて

電源を入れて温度と空気圧が設定値に達するまではエラーの画面が出ます。温度と空気圧が設定値に達すると、画面の右側に RUN のボタンが出て、動作できるようになります。PlateLoc 用のシールは数種類ありますが、SureSelect XT Low Input 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 °C から -80 °C の低温で保存できますが、それ以上の期間の保存には適していません。**1日より長く保存する場合、シールではなく、適切な Strip キャップなどをはめて密閉した状態で保管ください。**

電源オン

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

電源オフ

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

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

Bravo デッキヒートブロックの温度設定

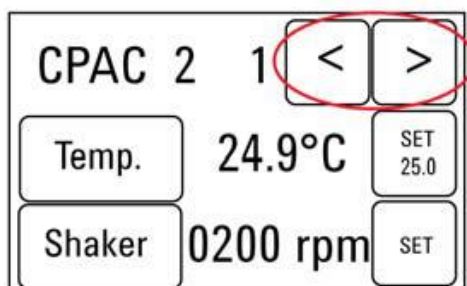
Bravo デッキ 4 番と 6 番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプルプレートをインキュベートするために使用しています。高温 (85°C) または低温 (4°C) でのインキュベーションステップを含むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておく、操作時間を短縮できます。

Bravo デッキヒートブロックの温度は、以下に説明する手順で Inheco Multi TEC Control 装置で変更することができます。Bravo のヒートブロック付きデッキの番号は、Inheco Multi TEC Control 装置で表 7 のように示されます。

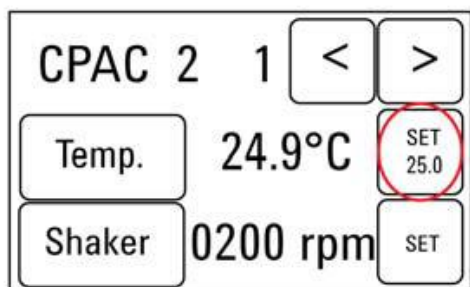
表 7 Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示

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

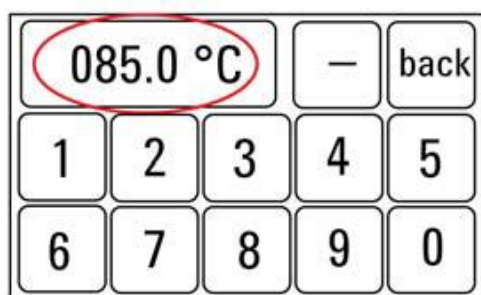
1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置 (CPAC 2 1 または CPAC 2 2) を選択します。



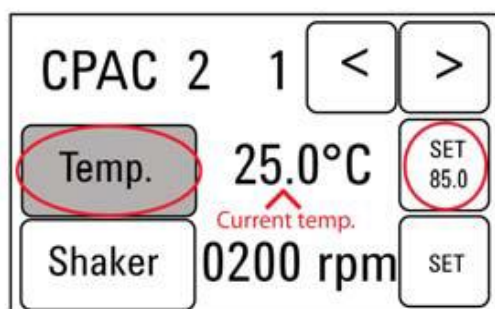
2. 選択したデッキ位置のヒートブロックの温度を設定するには、SET ボタンを押します。



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。



VWorks Automation Controlソフトウェア

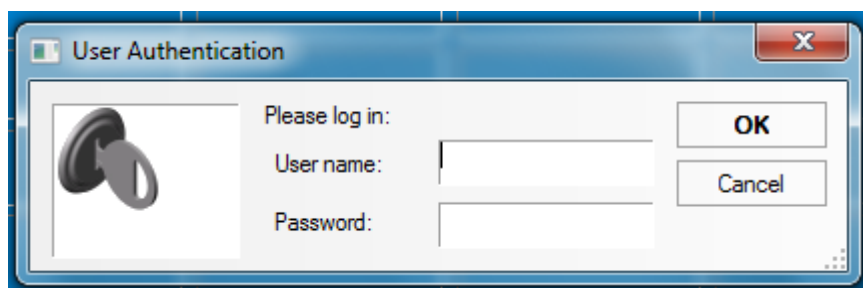
VWorks ソフトウェアはお使いの Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムに含まれ、ロボットと周辺機器をパソコンで制御できます。Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムには、SureSelect システムで必要な自動分注プロトコルがすべて入った VWorks ソフトウェアがあらかじめインストールされています。VWorks ソフトウェアを使い始める際の一般的な取扱い方と含まれるプロトコルについて、以下に説明します。SureSelect の各ステップの操作で指定された VWorks プロトコルを使用する際に、その VWorks 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 XT_LI_ILM_vB1.0.1.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。

SureSelect XT_LI_ILM_vB1.0.1.VWFormを使用したランの設定と開始

SureSelect XT_LI_ILM_vB1.0.1 を起動すると以下のようなフォームが表示されます。

SureSelect^{XT} Low Input
with Fast Hybridization
for Illumina sequencers

Parameters

1) 実行するプロトコルを選択
 TS_HighSensitivity_D1000_v.B1.0.1.pro
 AMPureXP Case: Not Applicable

2) サーマルサイクラーで使用するPCRプレートタイプを選択
 96 ABI PCR half skirt in Red Alum Insert

3) サンプル数(列数)を選択
 3 Columns selected

4) ボタンをクリックして初期ワークステーションセットアップ情報を表示
 Display Initial Workstation Setup Clear Workstation Setup Display

Controls

※ MiniHubの電源をOFFにしてプレートセットした場合は電源をONにした後に必ず右の [Initialize MiniHub] ボタンをクリックして下さい

Initialize MiniHub

全ての準備が整ったら [Run Protocol] ボタンをクリックしてください

Run Protocol Pause Full Screen ON/OFF

実行中のプロトコル: Elapsed Time: 00:00:53

Workstation Setup

	MiniHub Cassette 1	MiniHub Cassette 2	MiniHub Cassette 3	MiniHub Cassette 4
Shelf 5				
Shelf 4				
Shelf 3				
Shelf 2				
Shelf 1				

Bravo Deck

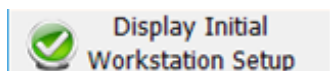
<Position 1>	<Position 2>	<Position 3>
<Pos 4: Peltier>	<Pos 5: Shaker>	<Pos 6: Peltier>
<Pos 7: Magnetic>	<Position 8>	<Pos 9: Chilled>

BenchCel

BenchCel Stacker 1	BenchCel Stacker 2	BenchCel Stacker 3	BenchCel Stacker 4

1. デスクトップの XT_LI_ILM_vB1.0.1.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。サンプルのカラム数は1つのカラムが 8 サンプルに対応しています。2 カラムは 16 サンプル、3 カラムは 24 サンプルとなり、最大 12 カラムとなります。

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。



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。

SureSelect^{XT} Low Input
with Fast Hybridization
for Illumina sequencers

Parameters

- 1) 実行するプロトコルを選択
 TS_HighSensitivity_D1000_v.B1.0.1.pro
 AMPureXP Case: Not Applicable
- 2) サーマルサイクラーで使用するPCRプレートタイプを選択
 96 ABI PCR half skirt in Red Alum Insert
- 3) サンプル数(列数)を選択
 3 Columns selected
- 4) ボタンをクリックして初期フォーカステーションセットアップ情報を表示
 Display Initial Workstation Setup Clear Workstation Setup Display

Controls

※ MiniHubの電源をOFFにしてプレートセットした場合は電源をONにした後に必ず右の [Initialize MiniHub] ボタンをクリックして下さい

Initialize MiniHub

全ての準備が整ったら [Run Protocol] ボタンをクリックしてください

Run Protocol Pause Full Screen ON/OFF

実行中のプロトコル: Elapsed Time: 00:00:53

Workstation Setup

MiniHub

	MiniHub Cassette 1	MiniHub Cassette 2	MiniHub Cassette 3	MiniHub Cassette 4
Shelf 5	Empty Nunc DeepWell Plate			
Shelf 4	Empty Eppendorf twin.tec Plate			
Shelf 3	Empty Eppendorf twin.tec Plate	Empty Eppendorf twin.tec Plate		
Shelf 2	New Tip Box	Nuclease-free Water Reservoir	AmpureXP Beads in Nunc DeepWell	
Shelf 1	Empty Tip Box	70% Ethanol Reservoir		Empty Tip Box

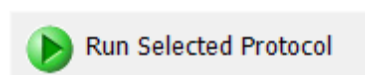
Bravo Deck

<Position 1> Waste Reservoir (96DW)	<Position 2>	<Position 3>
<Pos 4: Peltier>77~ Red Insert	<Pos 5: Shaker>	<Pos 6: Peltier>20~ Empty Eppendorf twin.tec Plate
<Pos 7: Magnetic> DNA in Eppendorf twin.tec Plate	<Position 8>	<Pos 9: Chilled>0~C Nunc DW Master Mix Plate (Col 1-3)

BenchCel

BenchCel Stacker 1	BenchCel Stacker 2	BenchCel Stacker 3	BenchCel Stacker 4
2 Tip Boxes	Empty	Empty	Empty

4. SureSelect XT Low Input 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。

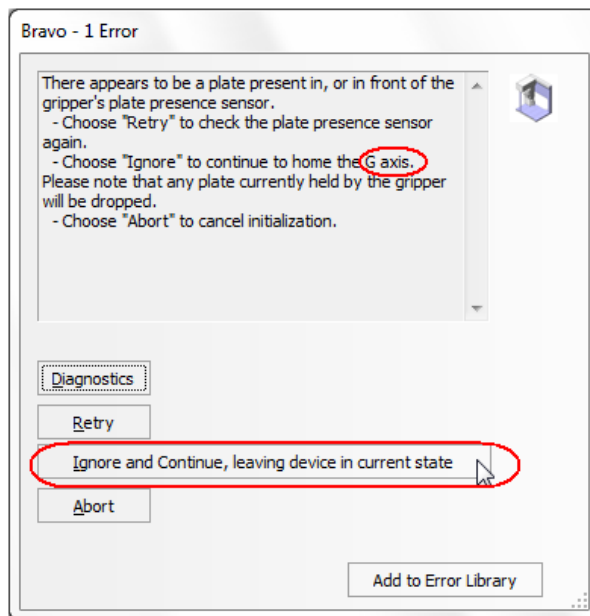


Bravoの初期化

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。必ず下記の指示に従って、操作してください。**この時点で選択を間違えると、初期化が正しく行われず、プロトコルをランしている途中でエラーで止まってしまいます。**正しい選択を行うように注意ください。

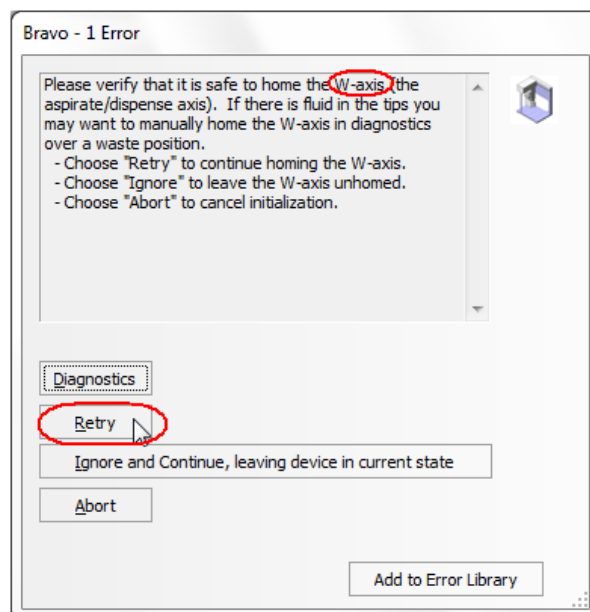
1. 最初はグリッパーの初期化に伴う **G axis** のエラー表示が出ます。

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 SureSelect XT Low Input 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。

- ・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。)



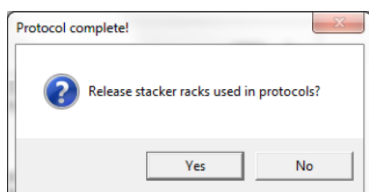
- ・そのインジケータに **Simulation is on** と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押してシミュレーションモードをオフにしてください。

NOTE

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

プロトコルまたはランセットの終了

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



VWorksの終了

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

1. VWorks の Form の画面に出ている Full Screen 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 Log out のアイコンをクリックします。



もし Control Tool Bar が画面に出ていない場合は、画面上部の View のメニューをクリックし、その中の Control Toll Bar を選択した状態にしてください。

3. Log out すると、このボタンが Log in に変わります。下記のユーザー名と password でログインしてください。

User Name: administrator

Pass word: administrator

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

SureSelect 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 Low Input ターゲットエンリッチメントのワークフローを図 2 に示します。

表 8 には、SureSelect のワークフローの中で使われる VWorks のプロトコルがまとめてあります。サンプルを処理する際に使用される 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、ハイブリダイゼーション後の増幅の各章を参照してください。

SureSelect XT Low Input NGS Target Enrichment Workflow

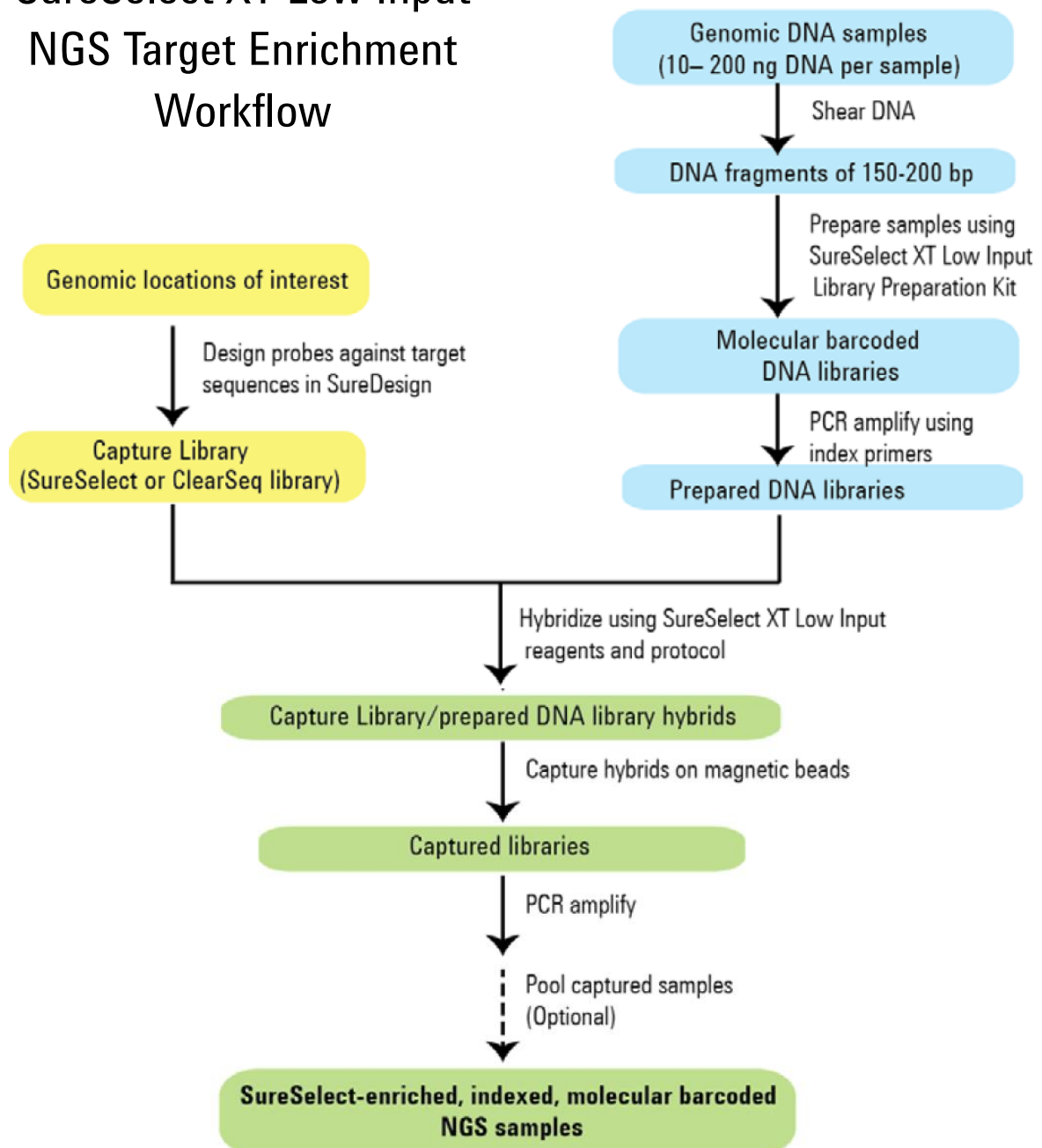


図 2 サンプル調製ワークフロー

表 8 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

ワークフロー ステップ	ステップ	Agilent SureSelect XT Low Input自動化システムで 使用されるVWorksプロトコル
サンプル調製	分子バーコードが付加されたライブラリの調製	LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst
	DNAライブラリの増幅	Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro
	DNAライブラリのAMPure XPビーズによる精製	AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Pre-Capture PCR
	Agilent TapeStationを用いた増幅ライブラリの解析	TS_D1000_v.B1.0.1.pro
ハイブリダイゼーション	ハイブリダイゼーションに使用する 500-1000 ngのライブラリ分取	Aliquot_Libraries_v.B1.0.1.pro
	キャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション	Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro
	DNAハイブリッドのキャプチャと洗浄	SSELCapture&Wash_XT_LI_v.B1.0.1.rst
ハイブリダイゼーション 後の増幅	キャプチャ後のDNAライブラリの増幅	Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro
	DNAライブラリのAMPure XPビーズによる精製	AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Post-Capture PCR
	Agilent TapeStationを用いた最終ライブラリの解析	TS_HighSensitivity_D1000_v.B1.0.1.pro

自動化ランを行う上での実験条件の検討

Agilent SureSelect XT Low Input 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。

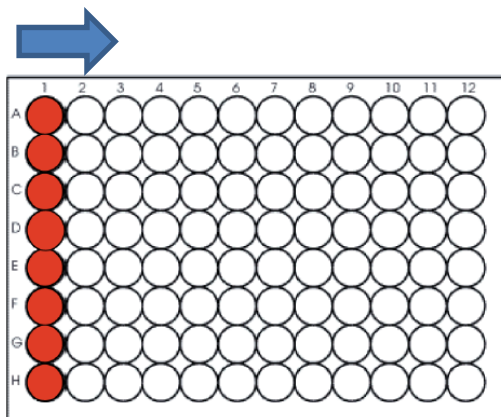
表 9 カラム数とサンプル数の対応表

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 SureSelect XT Low Input 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。



- サンプルインデックスはキャプチャ前の増幅時に付加されます (図 2 参照)。実験を計画する際、それぞれのサンプルに適切なインデックスを割り当て、適切な番号のインデックスプライマーを適切なウェル (サンプル) に割り当てるようにしてください。インデックスプライマーのプレート上の位置は p. 129 の表 82 と表 83 を参照ください。
- キャプチャ前の増幅ステップ (図 2 参照) では、インプット DNA の種類および量によって PCR 増幅サイクル数が異なることがあります。同じ PCR サイクル数となるインプット DNA の種類および量を同じプレートで処理するようにしてください。詳細はキャプチャ前の増幅ステップ p.52 の表 24 を参照ください。
- ハイブリダイゼーションのステップ (図 2 参照) 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 2 参照) 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 p. 97 の表 58 を参照ください。

装置の設置について

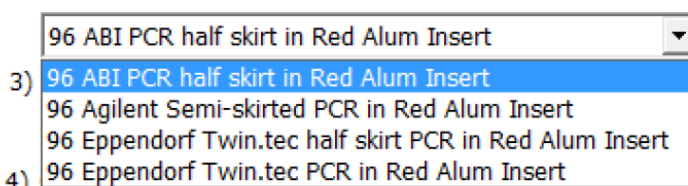
- ワークフローのハイブリダイゼーションのステップでは、Bravo デッキとサーマルサイクラとの間でサンプルプレートを迅速に動かす必要があります。使用するサーマルサイクラを Agilent SureSelect XT Low Input 自動化システムのできるだけ近くに設置し、迅速で効率的なプレート移動ができるようにしてください。

- ・ ワークフローのステップの中には、サンプルプレートに PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールした後、遠心してスピンド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 XT Low Input 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プレートについて

自動化プロトコルではサーマルサイクラへ PCR プレートを移動する準備として、PCR プレートに試薬を分注するステップが複数あります。これらのステップでは、各プレートに応じた正しい分注作業を行うため、SureSelect XT LI_ILM_vB1.01.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 プレートがサポートされているプレートであることを確認してください。実験で使用する PCR プレートの種類は以下のメニューで指定します。サポートされている PCR プレートの詳細については表 10 をご参照ください。

2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling



CAUTION

表 10 に記載されているプレートは様々なサーマルサイクラで使用でき、Agilent SureSelect 自動化プログラムでの使用がサポートされています。

いくつかのプレートは本プロトコルで推奨している SureCycler 8800 サーマルサイクラに適していません。SureCycler 8800 を使用する場合は、96 Agilent semi-skirted PCR plate を使用してください。

SureCycler 8800 以外のサーマルサイクラを使用する場合は、表 10 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ください。

表 10 サポートされている PCR プレート

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



3. サンプルの調製

- STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認 36
- STEP2. DNA の断片化 39
- STEP3. アダプター付加ライブラリの調製 41
- STEP4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅 50
- STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅した DNA の精製 58
- STEP6. ライブラリ DNA のサイズチェックと定量 62

SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントのワークフローの概要は p. 29 の図 2 をご参照ください。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 SureSelect XT Low Input 自動化システムを用いて調製する方法を説明します。各サンプルにそれぞれのインデックスと分子バーコードを付加します。

ライブラリ調製プロトコルは、fresh もしくは fresh frozen サンプルからの高品質の gDNA だけではなく、FFPE サンプルからの低品質の DNA にも対応しています。FFPE サンプルを使用する場合は、プロトコル全工程において、一部条件を変更する必要があります。FFPE サンプルを使用する際の変更内容のまとめは p. 123 の「6. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用」をご覧ください。

プロトコルでは、10 ng～200 ng のインプット DNA が必要であり、FFPE サンプルの場合、DNA インプット量や定量方法の調整が必要です。最適なシーケンス結果を得るために、推奨範囲内で、可能な限り最大量のインプット DNA を使用してください。

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認

Fresh なサンプルからの高品質 gDNA の調製

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

NOTE

gDNA サンプルが高品質であるには、OD_{260/280} の値が 1.8~2.0 であることを確認してください。

2. Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。
3. ライブラリ調製のために、各 DNA サンプルを 1X Low TE Buffer にて 10 ng~200 ng を 50 µL の容量になるよう調製します。ボルテックスミキサでよく混合し、軽く遠心し液をチューブの底にあつめます。サンプルは氷上に置きます。

Fresh なサンプルから調製した DNA は、その後更なる品質確認操作は不要です。p. 39 の「STEP2. DNA の断片化」に進みます。

FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認

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

NOTE

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

同じ日にライブラリ調製を行う場合は、精製後の gDNA は氷上に置きます。

ライブラリ調製が後日になる場合は、-20°C に保存します。

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

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

Agilent NGS FFPE DNA QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を決めることができます。 $\Delta\Delta Cq$ 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨内容は表 11 をご覧ください。

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

表 11 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

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

* $\Delta\Delta Cq$ が 1 以下の FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。
10~200 ng に必要な容量を計算するには qPCR による DNA 濃度ではなく、Qubit で測定した濃度を使用します。

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

Agilent 4200 TapeStation もしくは 2200 TapeStation を用いて Genomic DNA ScreenTape Assay を行い、電気泳動パターンから DNA サンプルの分解度を調べます。このアッセイでは、各サンプルについて DNA Integrity Number (DIN) の値が出力され、低品質 DNA の場合はその値をもとに DNA インプット量を決定します。

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 µL を Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay 用に分注します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- DIN の値をもとに、表 12 の内容を参照にして各サンプルのインプット量を決定してください。

表 12 DNA Integrity Number (DIN) の値に基づく、SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

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

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

- ライブラリ調製のために、各 DNA サンプルを 1X Low TE Buffer にて適したインプット量を 50 µL の容量になるよう調製します。DNA の分解度に基づいて、表 11 と表 12 に記載されている FFPE サンプル用のインプット量推奨内容を参照してください。

ボルテックスミキサでよく混合し、軽く遠心し液をチューブの底にあつめます。

サンプルは氷上に置きます。

STEP2. DNA の断片化

このステップでは、50 μ L の gDNA サンプルを、高品質もしくは FFPE の DNA のいずれかに最適化された条件により断片化します。断片化後の DNA のターゲットサイズは 150~200 bp です。

NOTE

本プロトコルは Covaris model E220 装置と 130 μ L Covaris microtube (p/n 520045)により条件が最適化されています。他の Covaris 装置やサンプルホルダーを用いる場合は、ターゲットサイズの DNA 断片が得られる条件について装置取り扱い会社にお問い合わせください。

1. コバリス E220 を起動します。

- 製造元の推奨に従い、使用する機器モデル、サンプルチューブまたはプレートでの最適なレベルまで脱イオン水をコバリスのタンクに注ぎます。
- チューブのガラス部分が水で覆われているか確認してください。
- コントロールパネル上で、Degas (脱ガス) ボタンを押します。最低 30 分以上脱ガスを行います(製造元の推奨に従ってください)。
- コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C~5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
- (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20% [v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。

コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。

2. 各 gDNA サンプルを、下記の手順にて断片化します。

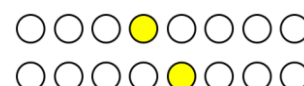
高品質 DNA サンプルもしくは FFPE DNA サンプルは、50 μ L の 1X Low TE Buffer に 10~200 ng gDNA が含まれている必要があります(必要量は DNA の分解度により決定します)。

- 先がテーパ状になったピペットチップを用い、コバリスの microTUBE のキャップ上面にあるスリットにチップの先を差し込んで、50 μ L DNA サンプルを Covaris microTUBE に移します。
- microTUBE を 30 秒遠心し、液を底に集め、底部にある泡を取り除きます。microTUBE 内に泡が残らないように注意してください(泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します)。

【microTUBE の遠心操作】

卓上遠心機の PCR チューブ用のアタッチメントにセットして軽くスピンドウンします。その際は右図の黄色の位置に microTUBE をセットします(1.5 mL チューブ用

のアタッチメントにはセットすることができません)。外側にセットした場合、遠心力が強すぎチューブが飛ぶ恐れがあります。



3. サンプル調製

- c. サンプルを入れた microTUBE を、コバリスのチューブホルダにセットします。表 13 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 13 Covaris E-series 装置による断片化設定条件 (SonoLab software v7 以降)

設定	高品質 DNA	FFPE DNA
Duty Factor	10%	10%
Peak Power	175	175
Cycles / Burst	200	200
Treatment 時間	2x120 sec	240 sec
温度	2°C から 8°C	2°C から 8°C

高品質 DNA のみ、下記の手順にて 2 段階で断片化を実施してください。

- ・ 120 秒断片化します。
 - ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
 - ・ microTUBE を高速のボルテックスミキサにより 5 秒間攪拌します。
 - ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
 - ・ さらに 120 秒断片化します。
 - ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
 - ・ microTUBE を高速のボルテックスミキサにより 5 秒間攪拌します。
 - ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
- d. 断片化が終了したら、microTUBE を microTUBE フォルダから取り出し、ローディングステーションの上に載せます。
- e. microTUBE の蓋をしたままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、サンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
- f. 断片化されたサンプル全量（約 50 μ L）を、新しい Eppendorf twin.tec 96-well plate に移します。サンプルを氷上に置きます。
- g. DNA サンプルを移した後、microTUBE を遠心し残存したサンプルを集めます。チューブ内に残ったサンプルをできるだけ回収し、step f のチューブに移します。

STEP3. アダプター付加ライブラリの調製

このステップでは、Agilent 自動化システムは SureSelect ターゲットエンリッチメントに必要な末端修復、dA 付加、分子バーコード付加を含む DNA 末端修飾ステップを行います。末端修飾後、自動化システムは AMPure XP ビーズを使用して DNA 精製を行います。

このステップでは表 14 に示す試薬を使用します。使用前に表 14 従い各試薬を溶解、混合してください。自動ランを開始する前に、各ステップの DNA サンプルを除くマスターミックス(余剰分を含む)を調製する必要があります。1, 2, 3, 4, 6, および 12 カラムに対応した各ランに必要なマスターミックスがそれぞれの表に示されています。

また、このステップでは Agencort AMPure XP ビーズも使用します。p. 45 で使用する前に室温に戻しておきます。

表 14 使用前に溶かしておく試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	p. 42
Ligation Buffer (bottle)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	p. 43
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	p. 42
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	p. 43
Adaptor Oligo Mix (white cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	p. 43

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照に Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 4 番の温度をあらかじめ 77°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
3. Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってデッキ 6 番の温度をあらかじめ 20°C に設定してください。Bravo デッキ 6 番は Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。
4. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキ 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。

末端修復/dA 付加マスターミックスの調製

5. 表 15 に従い適切な量の末端修復/dA 付加マスターミックスを調製します。試薬の混合やピペッティング作業は各項目の指示に従ってください。
 - a. 溶解した End Repair-A Tailing Buffer を高速のボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌し均一にします。溶液を目視で確認し、固形物がある場合は完全に溶解するまでボルテックスミキサーによる攪拌を続けます。

CAUTION

このステップで使用する End Repair-A Tailing Buffer は、分注する前に必ず高速のボルテックスミキサーで均一になるまで攪拌する必要があります。他の溶液と混合するときは、混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15-20 回繰り返し、よく混合します。

- b. End Repair-A Tailing Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ、1.5 mL エッペンドルフチューブまたはコニカルチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。
- c. End Repair-A Tailing Enzyme Mix をゆっくり加えた後 buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15-20 回繰り返しよく混合します（容量が大きい場合は、均一になるまで 15-30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌します）。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集め、氷上に置きます。

表 15 末端修復/dA 付加マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	16 µl	204 µl	340 µl	476 µl	612 µl	884 µl	1768 µl
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µl	51 µl	85 µl	119 µl	153 µl	221 µl	442 µl
Total Volume	20 µl	255 µl	425 µl	595 µl	765 µl	1105 µl	2210 µl

ライゲーションマスターミックスの調製

6. 表 16 に従い適切な量のライゲーションマスターミックスを調製します。試薬の混合やピペッティング作業は各項目の指示に従ってください。

- a. 溶解した Ligation Buffer を高速のボルテックスミキサで 15 秒間攪拌し均一にします。

CAUTION

このステップで使用される Ligation Buffer は粘性が非常に高いです。Master Mix の調製の前に、高速のボルテックスミキサで 15 秒間混合します。他の溶液と混合する際は混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15-20 回繰り返し、よく混合してください。

- b. Ligation Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ、1.5 mL エッペンドルフチューブまたはコニカルチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。
- c. T4 DNA Ligase をゆっくり加えた後 buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15-20 回繰り返しよく混合します（容量が大きい場合は、均一になるまで 15-30 秒間ボルテックスミキサで攪拌します）。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集めます。

表 16 ライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Ligation Buffer (bottle)	23 µl	293.3 µl	488.8 µl	684.3 µl	879.8 µl	1270.8 µl	2541.5 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	25.5 µl	42.5 µl	59.5 µl	76.5 µl	110.5 µl	221.0 µl
Total Volume	25 µl	318.8 µl	531.3 µl	743.8 µl	956.3 µl	1381.3 µl	2762.5 µl

Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製

7. 表 17 に従い Adaptor Oligo Mix 希釈液を調製します。ボルテックスミキサでよく混合し、氷上に起きます。

表 17 Adaptor Oligo Mix 希釈液の調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µl	42.5 µl	63.8 µl	85.0 µl	106.3 µl	143.5 µl	266.5 µl
Adaptor Oligo Mix (white cap)	5 µl	85.0 µl	127.5 µl	170.0 µl	212.5 µl	287.0 µl	533.0 µl
Total Volume	7.5 µl	127.5 µl	191.3 µl	255.0 µl	318.8 µl	430.5 µl	799.5 µl

3. サンプル調製

マスターミックスソースプレートの調製

8. Nunc DeepWell プレートにステップ 5 から 7 で調製したマスターミックスを含むマスターミックスソースプレートを調製します。表 18 に示す容量の各マスターミックスを Nunc DeepWell プレートの各カラムの全てのウェルに加えます。このマスターミックスソースプレートの最終的な配置は図 3 に示します。

表 18 LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst のためのマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
End Repair-dA Tailing master mix	Column 1 (A1-H1)	31.0 μ l	52.0 μ l	73.0 μ l	94.0 μ l	136.5 μ l	273.0 μ l
Ligation master mix	Column 2 (A2-H2)	36.0 μ l	62.0 μ l	88.0 μ l	114.0 μ l	169.0 μ l	338.0 μ l
Adaptor Oligo Mix dilution	Column 3 (A3-H3)	15.0 μ l	22.5 μ l	30.0 μ l	37.5 μ l	52.5 μ l	97.5 μ l

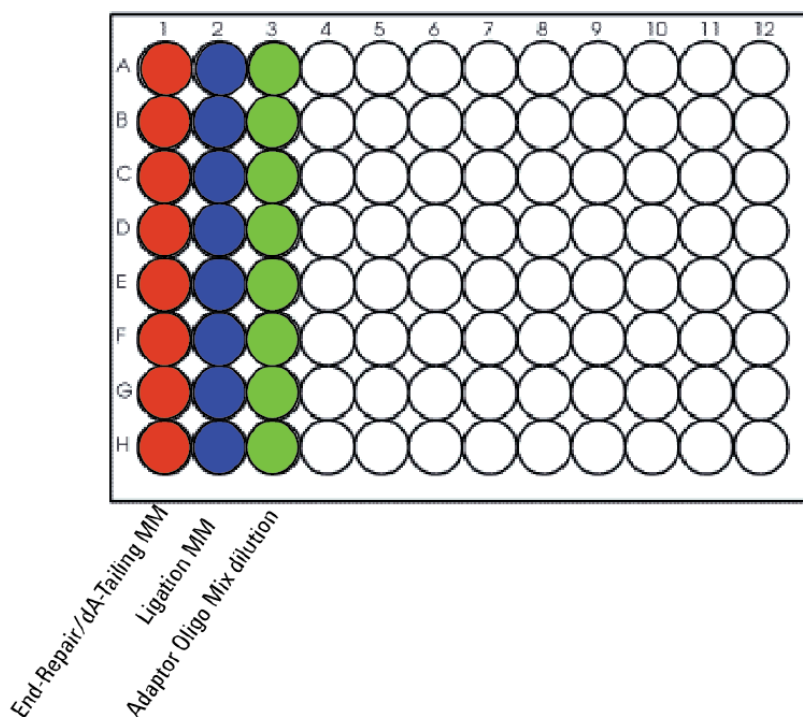


図 3 LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst 用のマスターミックスソースプレートの配置

9. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
10. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドアウンし気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo で正確に容量が測れないことがあります。必ずランを始める前にソースプレートをシールしスピンドアウンしてください。

精製用試薬の準備

11. AMPure XP ビーズが室温であることを確認してください。AMPure XP ビーズは冷凍保存しないよう注意してください。
12. ビーズの懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合してください。
13. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ 140 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。

NOTE

このステップで分注した 140 µL の AMPure XP ビーズは LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst とその後の AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro の精製ステップ両方で使用します。ライブラリ調製ランセットと精製プロトコルを同じ日に行わない場合は、AMPure XP ビーズソースプレートを確実にシールで蓋をして、4°C で保存してください。

14. 15 mL の Nuclease-free water を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
15. 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。

ワークステーションの準備

16. 表 19 にしたがって Labware MiniHub にプレート等をセットします。セットする際のプレートの向きは図 4 に示すとおり、A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になるようにプレートを置きます。

表 19 LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst 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	—	—	—
Shelf 4	Empty Eppendorf twin.tec plate	—	—	—
Shelf 3	Empty Eppendorf twin.tec plate	Empty Eppendorf twin.tec plate	—	—
Shelf 2	New tip box	Nuclease-free water reservoir from step 14	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 13	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	70% ethanol reservoir from step 15	—	Empty tip box

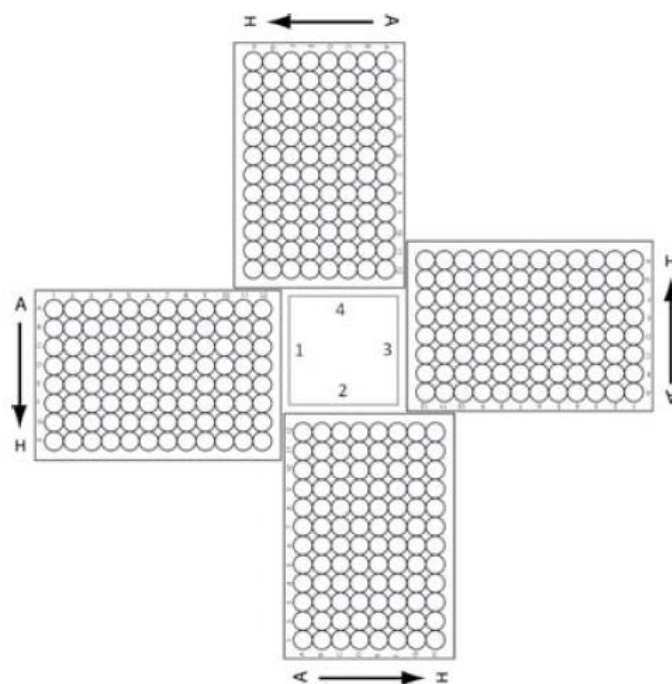


図 4 Agilent Labware MiniHub プレートの向き。ThermoScientific リザーバーの場合は、切り欠きのある角が MiniHub の中央に向くように置きます。

17. 表 20 にしたがって Bravo デッキにプレート等をセットします。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。

表 20 LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	Empty Eppendorf twin.tec plate
7	Eppendorf plate containing sheared gDNA samples
9	Library Prep Master Mix Source Plate, unsealed

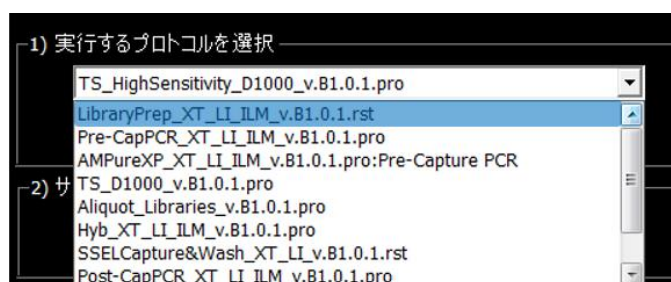
18. 表 21 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 21 LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	2 Tip boxes	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	3 Tip boxes	—	—	—
6	4 Tip boxes	—	—	—
12	8 Tip boxes	—	—	—

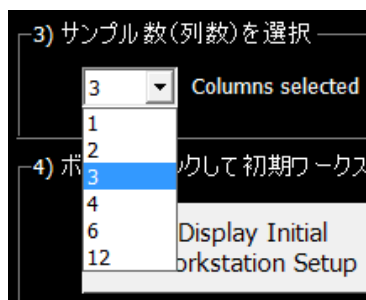
LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rstの実行

19. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst を選択します。

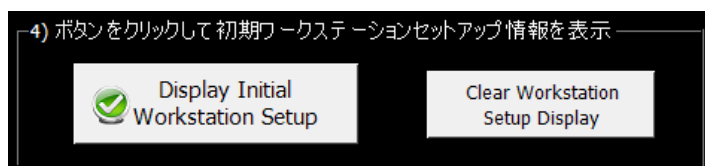


3. サンプル調製

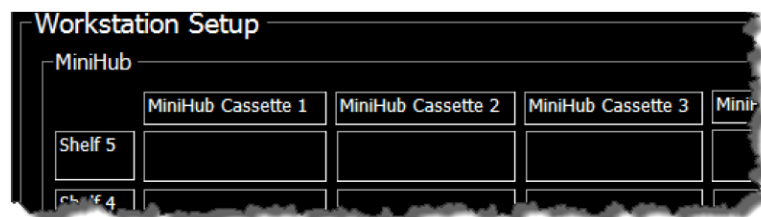
20. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



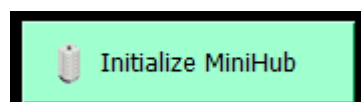
21. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



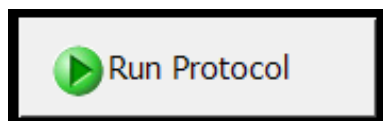
22. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



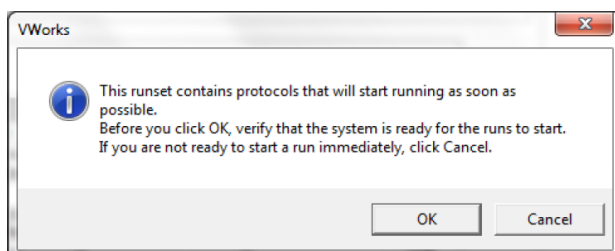
23. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。



24. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



25. ランの準備ができましたら、以下のウィンドウの OK をクリックしてください。



LibraryPrep_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst の実行には約 2 時間かかります。完了すると精製されたアダプター付加 DNA ライブラリは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf プレートの中に入っています。

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルプレートを実験用シールでシールし、4°Cで一晩、さらに長期保存の場合は-20°Cで保存してください。MiniHub の Shelf2 のカセット 3 から AMPure XP ビーズが入った Nunc DeepWell ソースプレートを取り出し、シールをして 4°Cで保存してください。

STEP4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅

このステップでは自動化システムでアダプター付 DNA サンプルの増幅とインデックス付加を行います。自動化システムのプロトコルが完了後、サーマルサイクラへ PCR プレートを移しライブラリの増幅を行います。

このステップでは表 22 に示し試薬を使用します。開始前に表に記載されている試薬を溶解し氷上に置きます。各試薬は使用前に表に従って混合してください。

表 22 キャプチャ前 PCR 増幅に使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	p. 52
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	p. 52
100 mM dNTP Mix (green cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	p. 52
Forward Primer (brown cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	p. 52
SureSelect XT Low Input Index Primers	SureSelect XT Low Input Index Primers for ILM (Pre PCR),* -20°C	Vortexing	p. 52

* インデックスプライマーは 96 ウェルプレートで、1-96 (黄、Index Plate1) もしくは 97-192 (赤、Index Plate2) がキットに含まれています。

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、PCR マスターミックスはラボで決められたクリーンエリアもしくは UV 滅菌灯を備えた PCR フード内で陽圧の環境下で調製してください。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub Shelf2 のカセット 3 に残っている AMPure XP ビーズが入った Nunc DeepWell プレートは後の精製プロトコルで使します。それ以外の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. チラーの電源を入れ、0°Cに設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 6 番の温度を 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。

サーマルサイクラの準備

5. 表 23 のプログラムをサーマルサイクラに設定します(蓋は加熱します)。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおして蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 23 キャプチャ前 PCR 増幅のためのサーマルサイクラのプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	8 to 14 インプット DNA の品質と量に基づいた サイクル数の推奨については 表 24 をご参照ください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

* サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 50 µL に設定してください。

表 24 推奨キャプチャ前 PCR サイクル数

Quality of Input DNA	Quantity of Input DNA	Cycles
Intact DNA from fresh sample	100 to 200 ng	8 cycles
	50 ng	9 cycles
	10 ng	11 cycles
FFPE sample DNA	100 to 200 ng*	11 cycles
	50 ng	12 cycles
	10 ng	14 cycles

* qPCR で決定した DNA 量または DIN の値を基にした DNA 量

キャプチャ前PCRマスターミックスとマスターミックスソースプレートの調製

6. 表 25 に従い、適切なキャプチャ前 PCR マスターミックスを調製します。ボルテックスミキサーでよく混合し、氷上に置きます。

表 25 キャプチャ前 PCR マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	6.5 µl	82.9 µl	138.1 µl	193.4 µl	248.6 µl	359.1 µl	718.3 µl
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µl	127.5 µl	212.5 µl	297.5 µl	382.5 µl	552.5 µl	1105 µl
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µl	6.4 µl	10.6 µl	14.9 µl	19.1 µl	27.6 µl	55.3 µl
Forward Primer (brown cap)	2 µl	25.5 µl	42.5 µl	59.5 µl	76.5 µl	110.5 µl	221.0 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	12.8 µl	21.3 µl	29.8 µl	38.3 µl	55.3 µl	110.5 µl
Total Volume	20 µl	255.1 µl	425.0 µl	595.1 µl	765 µl	1105 µl	2210 µl

7. LibraryPrep_XT_LI_LIM_v.B1.0.1.rst ランで使用したものと同一 Nunc DeepWell マスターミックスソースプレートに表 26 に示された量をカラム 4 の全てのウェルに加えます。マスターミックスソースプレートの最終的な配置は図 5 を参照ください。

表 26 Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用マスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of 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 4 (A4-H4)	31.0 μ l	52.0 μ l	73.0 μ l	94.0 μ l	136.5 μ l	273.0 μ l

NOTE

新しい Nunc DeepWell プレートを使用する場合は、コラム 1-3 は空のままにし、コラム 4 に PCR マスターミックスを入れてください。

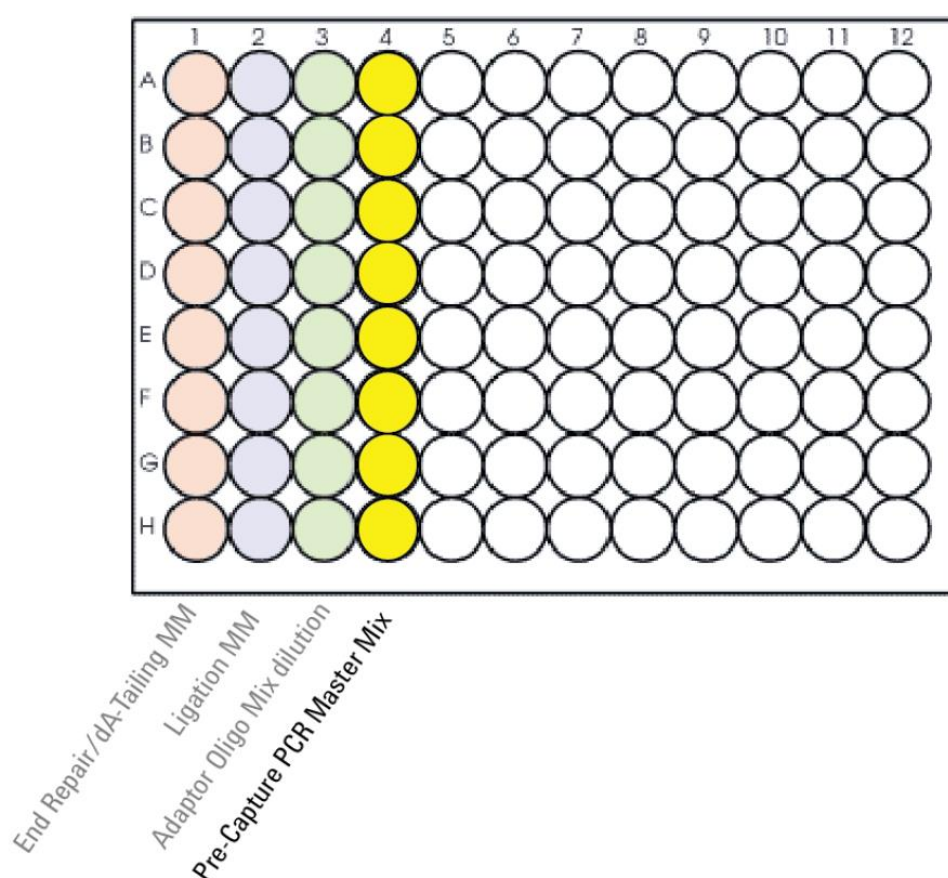


図 5 Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用マスターミックスソースプレートの配置

- マスターミックスソースプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1 秒です。
- プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo で正確に容量が測れないことがあります。
必ずランを始める前にソースプレートをシールしスピンドウンしてください。

キャプチャ前PCRインデックスプライマープレートの調製

10. 自動化プロトコルでの増幅用 PCR プレートに SureSelect XT Low Input インデックスプライマーを調製します。PCR プレートのそれぞれのウェルに 2 μ L の各サンプルに割り当てられたインデックスプライマーと 3 μ L の Nuclease-free water を加えます。プレートは氷上に置きます。

ワークステーションの準備

11. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 27 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 27 Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	—	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	—	—	—
Shelf 2	New tip box	—	(AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate (retained from previous runset-not used in this protocol))	—
Shelf 1 (Bottom)	Empty tip box	—	—	Empty tip box

12. 表 28 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 28 Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
6	SureSelect XT Low Input Index Primers in PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
7	Adaptor-ligated DNA samples in Eppendorf twin.tec plate
9	Master mix plate containing PCR Master Mix in Column 4 (unsealed)

13. 表 29 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 29 Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.proの実行

14. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro を選択します。

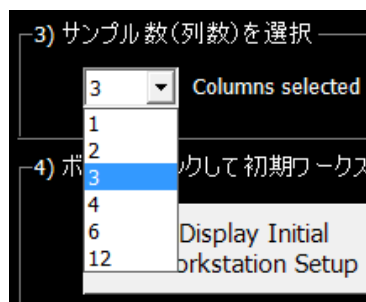


15. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」で Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択してください。

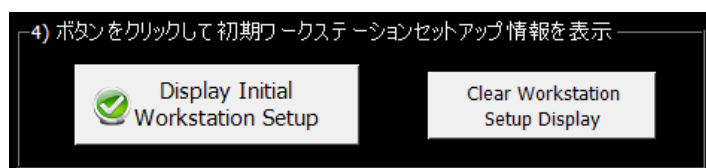


3. サンプル調製

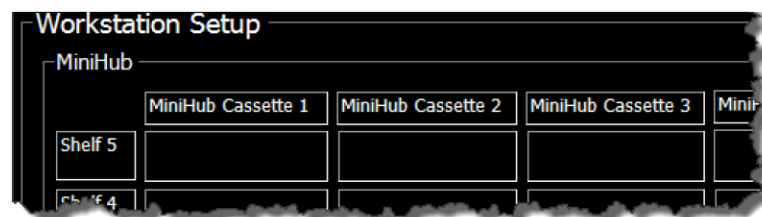
16. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



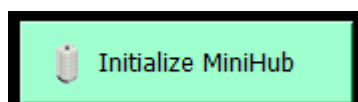
17. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



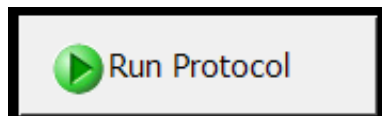
18. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



19. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

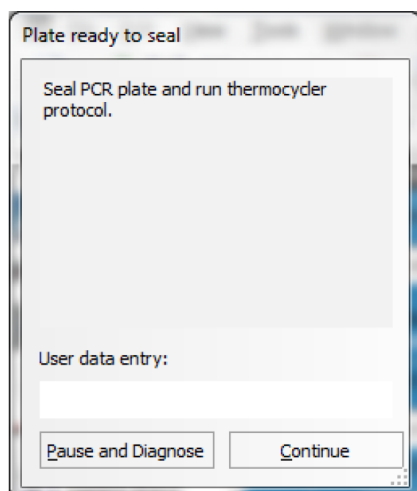


20. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



Pre-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro の実行には約 15 分かかります。完了すると調製された DNA と PCR マスターミックスを含み、PCR にかけるサンプルは Bravo デッキ 6 番の PCR プレートに入った状態になります。

21. 以下の指示が表示されたら Bravo デッキ 6 番から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、3 秒でシールします。



22. プレーートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。
23. プログラムをセットしたサーマルサイクラにサンプルを移す前にサーマルサイクラの Play ボタンを押し、表 23 のプログラムを開始しブロックの温度を 98°C にします。98°C に到達したらすぐにサンプルレートをサーマルサイクラのブロックにセットし蓋を閉めます。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度は高く、やけどをする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅した DNA の精製

このステップでは自動化システムで AMPure XP ビーズと増幅した DNA を Nunc DeepWell プレートに移し、ビーズに結合した DNA を集め洗浄する操作を実行します。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub の Shelf2、カセット 3 に残っている AMPure XP ビーズが入った Nunc DeepWell プレートはこのプロトコルで使用します。
それ以外の Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。

CAUTION

ワークステーションへのダメージを避けるため、Nunc DeepWell プレートはランを実施する前に必ずシールを剥がしていることを確認してください。

2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 45°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
4. チラーの電源を入れ、0°C に設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
5. 15 mL の Nuclease-free water 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. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 30 に従い Labware MiniHub にプレート等をセットします。

表 30 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty Eppendorf twin.tec Plate	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 5	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate (unsealed; retained from earlier runset)	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 6	—	Empty tip box

8. 表 31 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 31 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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)

9. 表 32 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 32 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	6 Tip boxes	—	—	—

AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Pre-Capture PCRの実行

10. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Pre-Capture PCR を選択します。



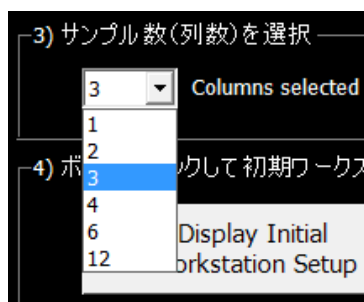
NOTE

AMPure XP 精製プロトコルは、SureSelect 自動化システムの複数のステップで使用します。自動化プロトコルを開始する際に正しいワークフローのステップを選択しているか確認してください。

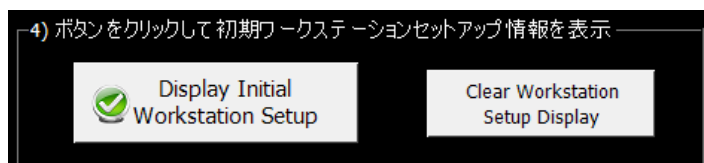
11. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」で Bravo デッキ 9 番にセットした PCR プレートを選択してください。



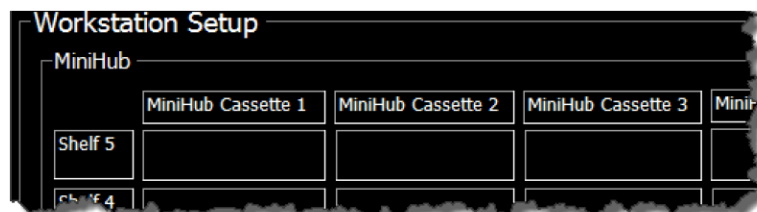
12. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



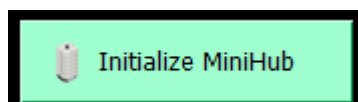
13. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



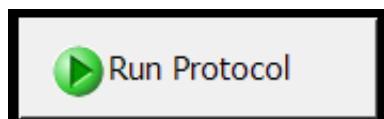
14. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか**必ず**確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



15. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。



16. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



精製プロトコルの実行には約 45 分かかります。完了すると精製された DNA サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

STEP6. ライブラリ DNA のサイズチェックと定量

サンプル解析は自動化サンプル調製プログラムを使用して Agilent 4200 TapeStation で行うか、手作業でサンプル調製を行い 2100 バイオアナライザで行います。

どの装置を使用する解析においても試薬類を使用前に室温に 30 分置き、完全に室温に戻してください。

Option1: Agilent 4200 TapeStationとD1000アッセイを使用する場合

ここでは 2 μ L の DNA サンプルと 6 μ L の D1000 Sample buffer を混合し、D1000 アッセイ用サンプルプレートに自動化プロトコル TS_D1000_v.B1.0.1.pro を用いて調製します。調製後、アッセイプレートを 4200 TapeStation に移し解析を行います。詳細は別途 D1000 Kit のマニュアルをご参照ください。

NOTE

必要に応じて、手作業でアッセイ用サンプルプレートを調製することができます。その際はガイドに従い、1 μ L の DNA サンプルと 3 μ L の Sample buffer を混合します。Electropherogram の解析は p. 66 のガイドラインをご参照ください。

ワークステーションとSample Bufferソースプレートの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキの 9 番を室温に戻すためチラーの電源を切ります (p21 参照)。
4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. 新しい Eppendorf twin.tec プレートをし、Sample Buffer ソースプレートを室温で調製します。表 33 に従い、カラム 1 の各ウェルに D1000 Sample Buffer を加えます。

表 33 TS_D1000_v.B1.0.1.pro 用の Sample Buffer ソースプレートの調製

Solution	Position on Source Plate	Volume of Sample Buffer added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
D1000 Sample Buffer	Column 1 (A1-H1)	11.0 μ L	17.0 μ L	23.0 μ L	29.0 μ L	41.0 μ L	77.0 μ L

ワークステーションの準備

6. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 34 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 34 TS_D1000_v.B1.0.1.pro 用の MiniHub の初期配置

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

7. 表 35 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 35 TS_D1000_v.B1.0.1.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Amplified pre-capture libraries in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty Eppendorf twin.tec plate
9	Eppendorf twin.tec source plate containing D1000 Sample Buffer in Column 1

CAUTION

Agilent 4200 TapeStation と自動化システムへのダメージを避けるため、アッセイプレートの調製の自動化には指定の Eppendorf twin.tec プレート (Eppendorf p/n 951020401 または 951020619) のみ使用してください。自動化プロトコルで調製したサンプルプレートを 2200 TapeStation の解析には使用しないでください。

3. サンプル調製

8. 表 36 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 36 TS_D1000_v.B1.0.1.pro 用の BenchCel の初期配置

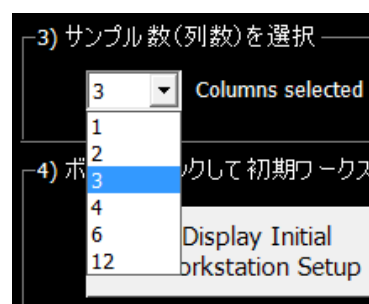
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

TS_D1000_v.B1.0.1.proの実行

9. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の TS_D1000_v.B1.0.1.pro を選択します。



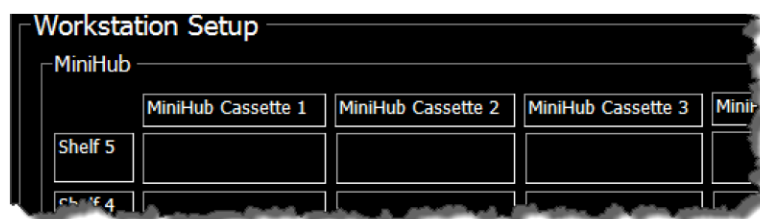
10. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



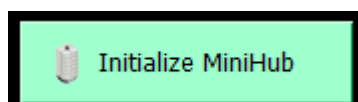
11. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



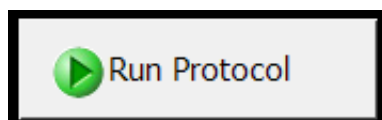
12. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



13. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

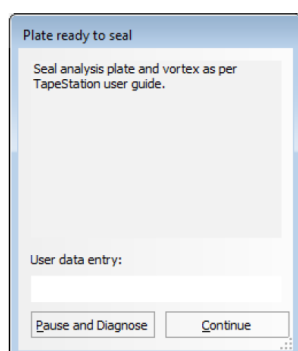


14. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



TS_D1000_v.B1.0.1.pro の実行には約 15 分かかります。解析用のサンプルを分取が完了後、Bravo デッキ 4 番にある DNA ライブラリサンプルプレートにシールし、p. 72 のハイブリダイゼーションのセットアップで使用するまで氷上に置きます。

15. 以下の指示が表示されたら、Bravo デッキ 6 番にある解析用サンプルが入った Eppendorf twin.tec プレートを取り出し、Continue をクリックしてください。D1000 アッセイプレートを Foil Seal でシールし、ユーザーガイドに従ってボルテックスミキサで混合してください。



CAUTION

4200 TapeStation へのダメージを避けるため、指定の 96-well plate foil seals (Agilent p/n 5067-5154)のみを使用してください。

正確な定量のため、DNA と Sample buffer はボルテックスミキサで 1 分間混合し、完全に混合されていることを確認してください。その後、液を集めるためスピンドウンをしてください。

D1000アッセイでの泳動とデータの解析

16. ユーザーガイドに従い、解析用サンプルプレート、D1000 ScreenTape、Loading tips を装置にセットしてください。泳動を開始します。
17. 解析終了後、電気泳動図(electropherogram)により、高品質の DNA の場合は約 300-400 bp、FFPE DNA の場合は約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 6(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 7(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 8(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。
目的とされるピーク以外に低分子領域にピークが生じている場合、アダプターダイマーの存在が示唆されてます。p. 66- p. 67 図 6、図 7、図 8、と同程度に占められている割合が低い場合は、そのライブラリサンプルを用いてターゲットエンリッチメントの工程に進むことができます。その他については p. 132 のトラブルシューティング情報をご参照ください。
18. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。
ハイブリダイゼーション反応には調製したライブラリが 500-1000 ng が必要です(液量 12 μ L)。

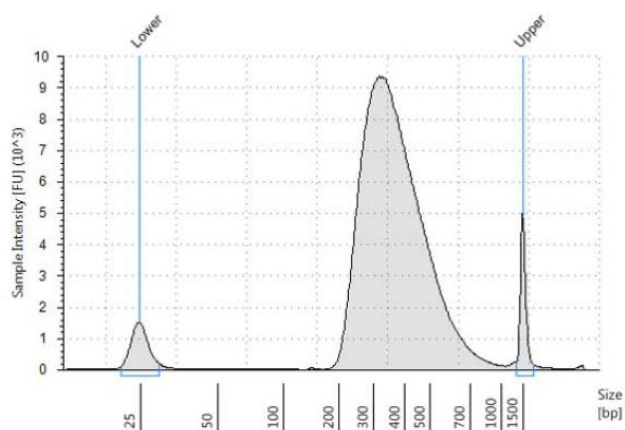


図 6 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図(D1000 アッセイ)

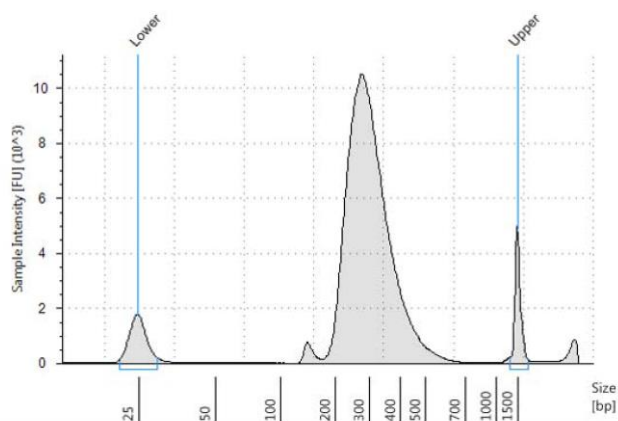


図 7 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリ電気泳動図(D1000 アッセイ)

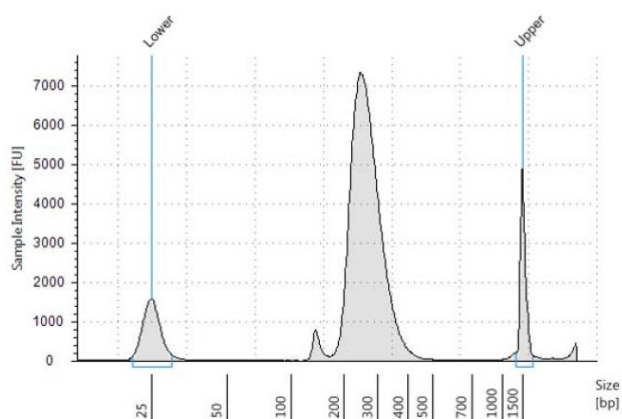


図 8 低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
(D1000 アッセイ)

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし-20℃で保存してください。

Option2: Agilent 2100バイオアナライザとDNA1000アッセイを使用する場合

DNA1000 試薬キットと DNA チップを使用します。詳細は別途 DNA1000 Kit のマニュアルをご参照ください。

1. Kit のマニュアルに従い、2100 バイオアナライザをセットアップします。
2. Kit のマニュアルに従い、チップ、サンプルラダを調製します。各サンプル 1 μL をアッセイに用います。チップ調製後 5 分以内に装置にセットし、泳動を開始してください。
3. 解析終了後、電気泳動図(electropherogram)により、高品質の DNA の場合は約 300-400 bp、FFPE DNA の場合は約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 9(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 10(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 11(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。

目的とされるピーク以外に低分子領域にピークが生じている場合、アダプターダイマーの存在が示唆されてます。p. 68-p. 69 図 9、図 10、図 11 と同程度に占められている割合が低い場合は、そのライブラリサンプルを用いてターゲットエンリッチメントの工程に進むことができます。その他については p. 132 のトラブルシューティング情報をご参照ください。

4. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。より高精度に定量するために、濃度が解析試薬の定量範囲内であることを確認してください。

ハイブリダイゼーション反応には調製したライブラリが 500-1000 ng 必要です(液量 12 μL)。

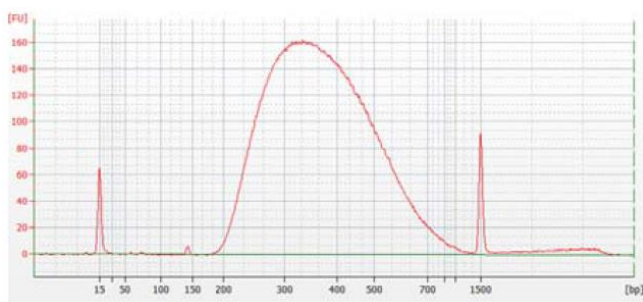


図 9 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図(DNA1000 アッセイ)

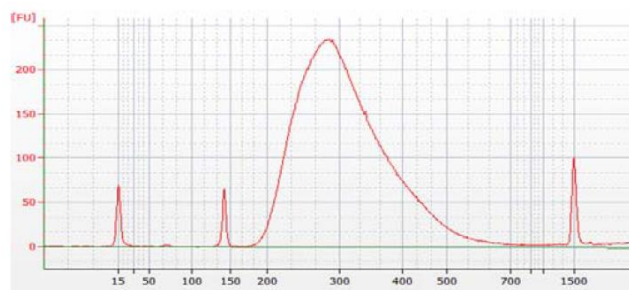


図 10 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリ電気泳動図(DNA1000 アッセイ)

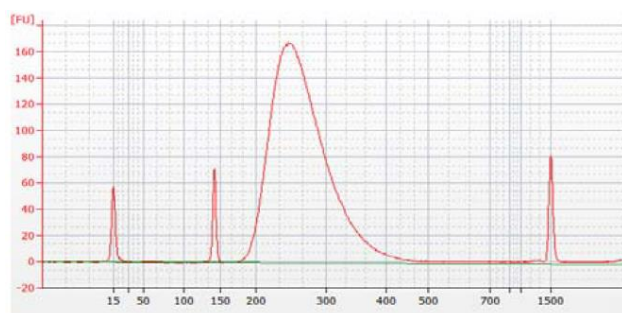


図 11 低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
(DNA1000 アッセイ)

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし-20℃で保存してください。



4. ハイブリダイゼーション

- STEP1. ハイブリダイゼーションのための調製済み
DNA サンプルの分取 71
- STEP2. DNA ライブラリとキャプチャライブラリのハ
イブリダイゼーション 75
- STEP3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャと洗浄 88

この章では SureSelect または ClearSeq キャプチャライブラリを用いたハイブリダイゼーションとキャプチャの工程が示されています。それぞれの DNA ライブラリサンプルは別々にハイブリダイズしてキャプチャする必要があります。

CAUTION

キャプチャライブラリと調製した DNA ライブラリの比率は、高いキャプチャ効率を得るために極めて重要です。プロトコルに記載されている量に従い、ハイブリダイゼーションを行ってください。

CAUTION

ハイブリダイゼーション中に液の蒸発があると結果に悪い影響を与えます。最初の実験を始める前に、使用するハイブリダイゼーションの条件で 4 μ L 以上の溶液の蒸発がないか確認してください。

CAUTION

キャプチャの特異性を確保するためには、ハイブリダイゼーションの反応液を 65°C に維持することが非常に重要です。プロトコルの各ステップの指示に従い、反応液の温度をなるべく下げないように注意してください。

STEP1. ハイブリダイゼーションのための調製済み DNA サンプルの分取

各サンプルは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反応には調製したライブラリが 500-1000 ng が必要です(液量 12 µL)。この範囲でなるべく多くの量をハイブリダイゼーションに使用してください。

p. 66-p.69 で計算したサンプルの濃度を用いて、ハイブリダイゼーションに使用する液量を以下の式で計算します。

$$\text{Volume (}\mu\text{L)} = 1000 \text{ ng/concentration (ng/}\mu\text{L)}$$

推奨の 1000 ng に満たないサンプルがあった場合、残りの DNA サンプルを全量(約 10-12 µL、少なくとも 500 ng を含むこと)をハイブリダイゼーションのステップで使用してください。

自動化プロトコル Aliquot_Libraries_v.B1.0.1.pro を実行し、ハイブリダイゼーションに使用する各 DNA サンプルの適切な量を新しいプレートに分取することができます。自動化プロトコルを実行する前に、各サンプルの分取する液量を自動化システムに指示するための表を以下のステップに従い作成する必要があります。

- 図 12 に示すヘッダーをつけた.csv (comma separated value) ファイルを作成します。ヘッダーの文字はスペースを含まないようにしてください。この表は Microsoft の Excel などのスプレッドシート作成アプリケーションを使って作成し、保存する際に.csv フォーマットにすることもできます。このファイルはプレートの全 96 ウェル分の行(rows)を含む必要があります。
- 各 DNA サンプルについてヘッダーの項目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、全ての 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、それぞれのサンプルのハイブリダイゼーションに使用する液量(µL)を入力します。プレート上の空のウェルは図 12 に示すように全て 0 を入力してください。
使用しないウェルの行は消さないでください。

4. ハイブリダイゼーション

	A	B	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	SamplePlateXYZ	D2	D2	0

図 12 サンプルスプレッドシート(1 カラムラン用)

NOTE

サンプルスプレッドシートは以下のフォルダに保存されています。

C:>VWorks Workspace>NGS Option B>XT_LI_ILM_v.B1.0.1>Aliquot Library Input Files>Aliquot_Libraries_template.csv

Aliquot_Libraries_template.csv ファイルをコピーし、

各 Aliquot_Libraries_v.B1.0.1pro のランの csv ファイルを作成するためのテンプレートとして使用できます。12 カラム(96 サンプル)より少ないランのテンプレートとして使用する場合、96 ウェル分の行があること、使用しないウェルの Volume の列は 0 が入力されていることを確認してください。

3. VWorks ソフトウェアがインストールされている PC の以下のフォルダに.csv ファイルをロードします。
C:>VWorks Workspace>NGS Option B>XT_LI_ILM_v.B1.0.1>Aliquot Library Input Files
4. チラーの電源を入れ、0°Cに設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。
5. 表 37 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 37 Aliquot_Libraries_v.B1.0.1pro 用の Bravo デッキの初期配置

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

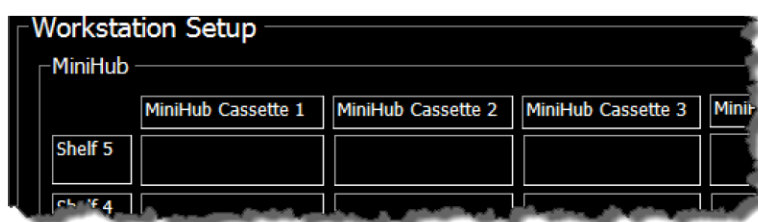
6. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の **Aliquot_Libraries_v.B1.0.1pro** を選択します。



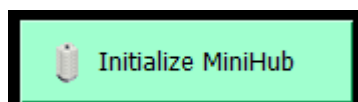
7. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



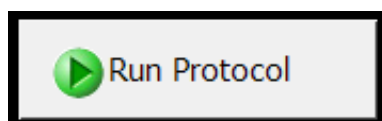
8. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



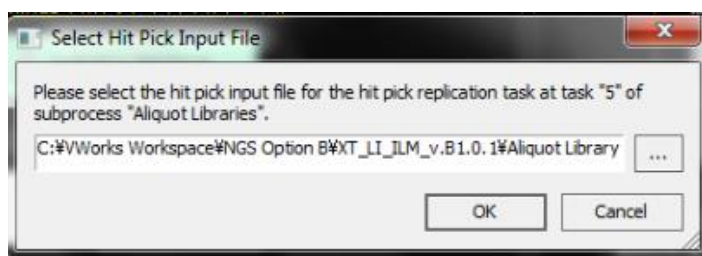
9. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。



10. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



11. 以下のダイアログボックスが表示されたら、このランのために step 3 で作成した.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。



4. ハイブリダイゼーション

Aliquot_Libraries_v.B1.0.1pro の実行には 96 サンプルで約 1 時間かかります。DNA サンプルプレートは Bravo デッキ 5 番のプレートに入った状態になります。

12. Bravo デッキからサンプルプレートを取り、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. 乾燥した各サンプルに 12 μ L の Nuclease-free water を加えます。各ウェルの内壁に沿ってサンプルを再溶解させるよう、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 秒です。
15. プレートを 30 秒間ボルテックスミキサで混合し完全に溶解させた後、1 分間遠心し壁やプレートシールについた液をスピンドウンします。

STEP2. DNA ライブラリとキャプチャライブラリのハイブリダイゼーション

このステップでは自動化プロトコル Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro を使用して、ハイブリダイゼーション反応のセットアップを行います。その後、サーマルサイクラにサンプルプレートを移動し、65°Cで保温して SureSelect または ClearSeq キャプチャライブラリへの DNA サンプルのハイブリダイゼーションを行います。

このステップでは表 38 に示す試薬を使用します。使用前に表 38 の指示に従い各試薬を溶解し、ボルテックスミキサで混合、スピンドウンをして液を集めてください。

表 38 ハイブリダイゼーションで使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Where Used
SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix (blue cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	p. 77
SureSelect RNase Block (purple cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	p. 79
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw and keep at Room Temperature	p. 77
Capture Library	-80°C	Thaw on ice	p. 79

サーマルサイクラの準備

1. 表 39 のプログラムをサーマルサイクラに設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおして蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。
必要なサンプルと試薬の温度を維持するために、ハイブリダイゼーションの自動化プログラムを始める前にサーマルサイクラのプログラムを事前に設定しておくことが重要です。

表 39 ハイブリダイゼーションのためのサーマルサイクラのプログラム*

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 [†]	1	65°C	Hold
4	Hybridization	60	65°C [‡]	1 minute
			37°C	3 seconds
5	Hold until start of Capture ^{**}	1	65°C [‡]	Hold

* サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 30 µL に設定してください (Segment4 のサイクルでのハイブリダイゼーション反応の最終液量)。

[†] VWorks ソフトウェアで指示が表示された後、サンプルを Hold ステップの間にワークステーションに移します。

[‡] ハイブリダイゼーションの温度 (Segment4 と 5) を 60°C に下げることによって AT-rich の領域のカバレッジが向上する可能性があります。

** p. 88 で始まるキャプチャと洗浄自動化プロトコルまでサンプルは 65°C で維持します。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度は高く、やけどをする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

ワークステーションの準備

- Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
- DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
- チラーの電源を入れ、0°C に設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
- 赤いアルミニウムインサートを Bravo デッキ 4 番と 6 番に置きます。
- 空のチップボックスを MiniHub shelf2 のカセット 4 にセットします。
- 表 40 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 40 Hyb_XT_LIILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	2 Tip boxes	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	3 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	5 Tip boxes	—	—	—

Blockマスターミックスの調製

8. 表 41 に従い、適切な Block マスターミックスを氷上で調製します。

表 41 Block マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µl	31.9 µl	53.1 µl	74.4 µl	95.6 µl	138.1 µl	276.3 µl
SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix (blue cap)	5.0 µl	63.8 µl	106.3 µl	148.8 µl	191.3 µl	276.3 µl	552.5 µl
Total Volume	7.5 µl	95.6 µl	159.4 µl	223.1 µl	286.9 µl	414.4 µl	828.8 µl

Hybridization Bufferマスターミックスの調製

9. 表 42 に従い、適切な Hybridization Buffer マスターミックスを室温で調製します。

表 42 Hybridization Buffer マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µl	53.1 µl	74.4 µl	95.6 µl	116.9 µl	159.4 µl	297.5 µl
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	6.0 µl	127.5 µl	178.5 µl	229.5 µl	280.5 µl	382.5 µl	714.0 µl
Total Volume	8.5 µl	180.6 µl	252.9 µl	325.1 µl	397.4 µl	541.9 µl	1011.5 µl

1つまたは複数のCapture Libraryマスターミックスの調製

10. 表 43～表 46に従い、ハイブリダイゼーションに使用する各キャプチャライブラリにおいて適切な量を調製します。高速のボルテックスミキサで完全に混合し、スピンドウンをして氷上に置いておきます。

NOTE

調製した DNA サンプルプレートのそれぞれの Row(行)に異なるキャプチャライブラリをハイブリダイズすることができます。しかし、キャプチャライブラリのサイズが異なるとキャプチャ後増幅でのサイクル数が異なります。同じプレートには同じ PCR サイクル数となるターゲットサイズのライブラリをハイブリダイズさせるように実験計画を立ててください。プレートの全ての Row で 1 種類のキャプチャライブラリを使用するランの場合、p.79 の step a (表 43 または表 44)に従ってマスターミックスを調製してください。

個々の Row で異なるキャプチャライブラリを使用するランの場合、p. 80 の step b (表 45 または表 46)に従ってマスターミックスを調製してください。

- a. 全ての row で 1 つのキャプチャライブラリを使用するランの場合、キャプチャライブラリのサイズに応じて表 43 または表 44 に従って Capture Library マスターミックスを調製してください。

表 43 ターゲットサイズ **3 Mb 未満** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、8 rows 分

Target size <3.0 Mb							
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	4.5 µl	76.5 µl	114.8 µl	153.0 µl	191.3 µl	306.0 µl	592.9 µl
RNase Block (purple cap)	0.5 µl	8.5 µl	12.8 µl	17.0 µl	21.3 µl	34.0 µl	65.9 µl
Capture Library	2.0 µl	34.0 µl	51.0 µl	68.0 µl	85.0 µl	136.0 µl	263.5 µl
Total Volume	7.0 µl	119.0 µl	178.6 µl	238.0 µl	297.6 µl	476.0 µl	922.3 µl

表 44 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、8 rows 分

Target size ≥3.0 Mb							
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	1.5 µl	25.5 µl	38.3 µl	51.0 µl	63.8 µl	102.0 µl	197.6 µl
RNase Block (purple cap)	0.5 µl	8.5 µl	12.8 µl	17.0 µl	21.3 µl	34.0 µl	65.9 µl
Capture Library	5.0 µl	85.0 µl	127.5 µl	170.0 µl	212.5 µl	340.0 µl	658.8 µl
Total Volume	7.0 µl	119.0 µl	178.6 µl	238.0 µl	297.6 µl	476.0 µl	922.3 µl

4. ハイブリダイゼーション

- b. 個々の row で異なるキャプチャライブラリを使用するランの場合、キャプチャライブラリのサイズに応じて表 45 または表 46 に従って Capture Library マスターミックスを調製してください。表 45 と表 46 に示す液量はサンプルウェル 1row 分です。複数の row で同じキャプチャライブラリをハイブリダイズする場合は、下表に示す量に使用する予定の row 数をかけてください。ピペット操作のロス分も考慮してください。

表 45 ターゲットサイズ **3 Mb 未満** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分

Target size <3.0 Mb							
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	4.5 µl	9.0 µl	13.8 µl	18.6 µl	23.3 µl	37.7 µl	73.5 µl
RNase Block (purple cap)	0.5 µl	1.0 µl	1.5 µl	2.1 µl	2.6 µl	4.2 µl	8.2 µl
Capture Library	2.0 µl	4.0 µl	6.1 µl	8.3 µl	10.4 µl	16.8 µl	32.7 µl
Total Volume	7.0 µl	14.0 µl	21.4 µl	28.9 µl	36.3 µl	58.6 µl	114.4 µl

表 46 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のキャプチャライブラリの場合の Capture Library マスターミックス、1 row 分

Target size >3.0 Mb							
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	1.5 µl	3.0 µl	4.6 µl	6.2 µl	7.8 µl	12.6 µl	24.5 µl
RNase Block (purple cap)	0.5 µl	1.0 µl	1.5 µl	2.1 µl	2.6 µl	4.2 µl	8.2 µl
Capture Library	5.0 µl	10.0 µl	15.3 µl	20.6 µl	25.9 µl	41.9 µl	81.7 µl
Total Volume	7.0 µl	14.0 µl	21.4 µl	28.9 µl	36.3 µl	58.6 µl	114.4 µl

マスターミックスのソースプレートの調製

11. step 8 から step 10 で調製したマスターミックスを **Eppendorf twin.tec プレート** にいれハイブリダイゼーションマスターミックスソースプレートを室温で調製します。表 47 に従い、各マスターミックスを指定された Eppendorf twin.tec プレートのカラムの各ウェルに加えます。

1 回のランで複数のキャプチャライブラリを使用する場合は、Capture Library マスターミックスを Eppendorf twin.tec プレートの適切な row に加えてください。マスターミックスソースプレートは最終的な配置を図 13 に示します。

表 47 Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用のマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
Block master mix	Column 1 (A1-H1)	11.0 µl	19.0 µl	27.0 µl	34.9 µl	50.9 µl	102.7 µl
Capture Library master mix	Column 2 (A2-H2)	14.0 µl	21.4 µl	28.9 µl	36.3 µl	58.6 µl	114.4 µl
Hybridization Buffer master mix	Column 3 (A3-H3)	19.9 µl	29.0 µl	38.0 µl	47.0 µl	65.1 µl	123.8 µl

4. ハイブリダイゼーション

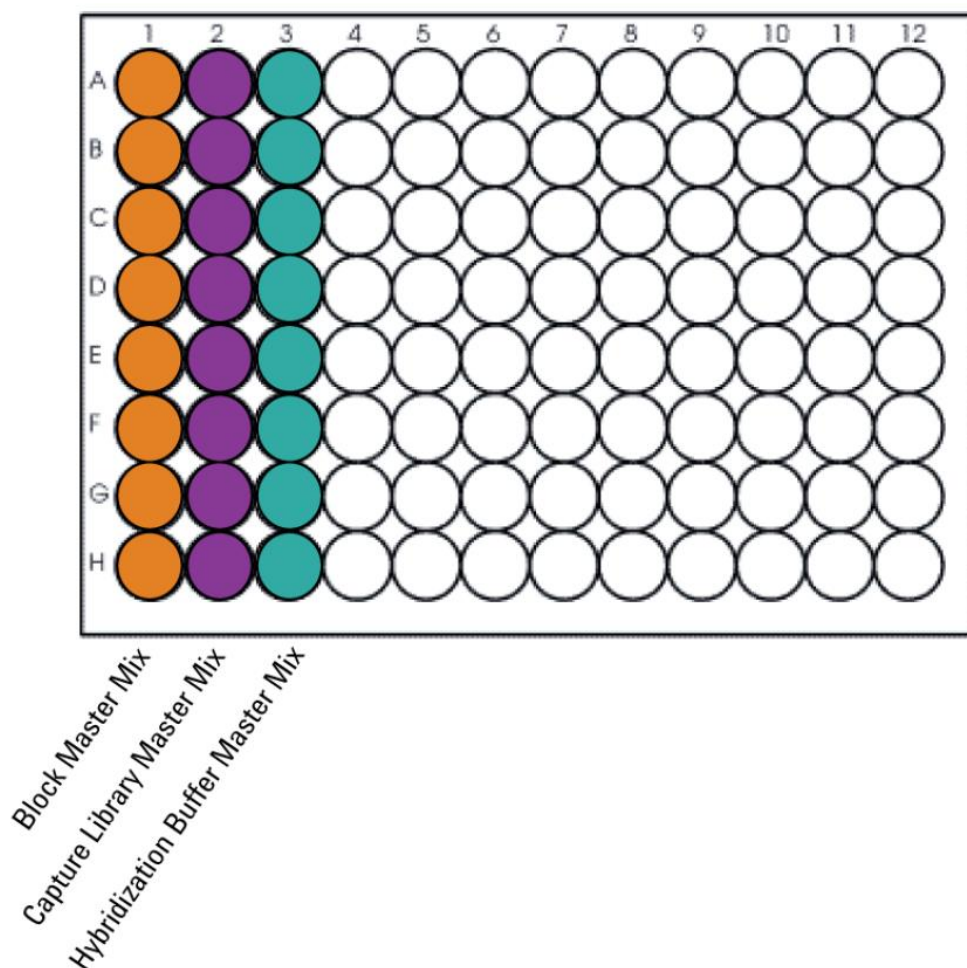


図 13 Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1 用のマスターミックスソースプレートの配置
Column2 には各 row に異なるキャプチャライブラリを入れることができます。

12. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
13. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きプレートシールをはがします。はがす時に反動で液がはねないように注意してください。Bravo デッキのセットアップにすぐに進んでください。マスターミックスプレートを室温に置く時間をできるだけ短くするようにしてください。

Bravoデッキのセットアップ

14. 表 48 に従って Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 48 Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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 twin.tec plate
6	Eppendorf twin.tec Master Mix source plate (unsealed) seated in red insert
8	Empty tip box
9	Prepared gDNA aliquots in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)

Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.proの実行

15. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の **Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro** を選択します。

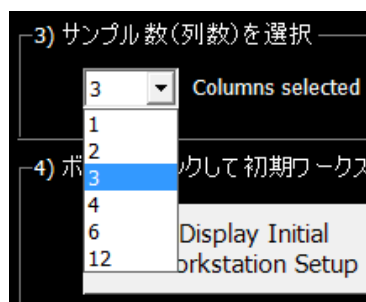


16. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」で Bravo デッキ 4 番にセットした PCR プレートを選択してください。



4. ハイブリダイゼーション

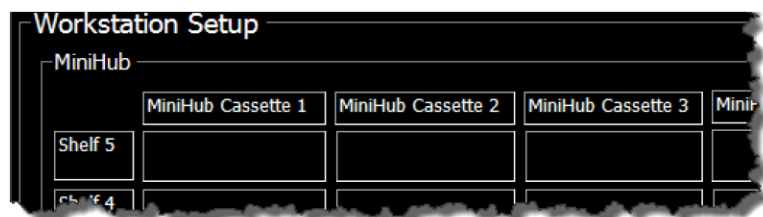
17. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



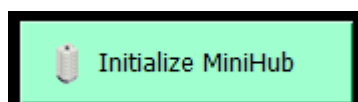
18. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



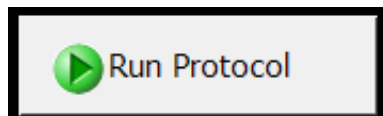
19. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



20. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

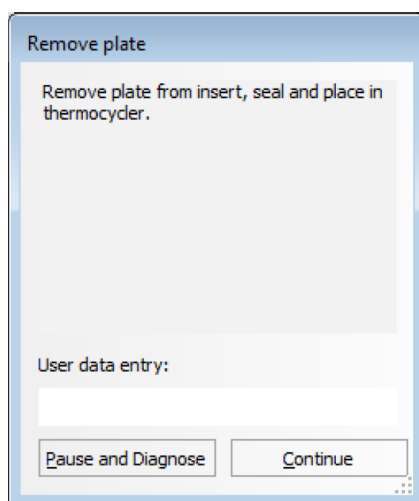


21. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



自動化システムは調製した DNA ライブラリと分注した Block マスターミックスを混合します。作業が完了すると、ハイブリダイゼーション前のサンプルの熱変性とブロッキングのためにプレートをサーマルサイクラに移すようメッセージが表示されます。

22. VWorks で以下に示すメッセージが表示されたら、PCR プレート Bravo デッキ 4 番から赤いアルミニウムインサートは残したまま取り出します。サンプルプレートを取り出した後、**Continue** をクリックしてください。



23. サンプルプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、3 秒です。
24. シールしたプレートをサーマルサイクラに移し、p76、表 39 で示した反応を開始します。熱変性とブロッキングの segment は図 14 を参照にしてください。

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†	1	65°C	Hold

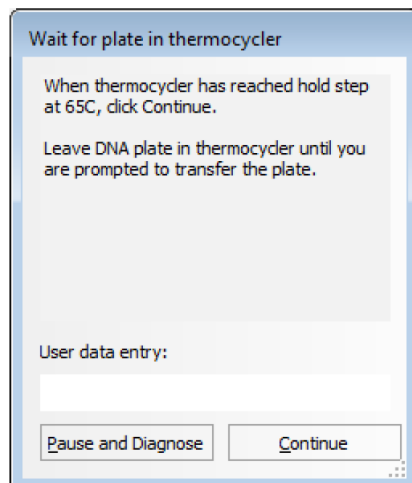
図 14 ハイブリダイゼーション前のサンプル熱変性とブロッキングのプログラム

サーマルサイクラでサンプルをインキュベートしている間、自動化プログラムは Capture Library 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。

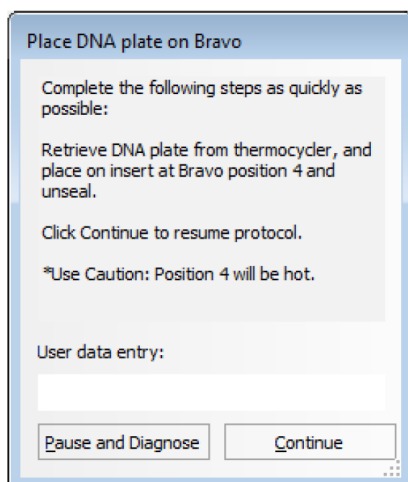
CAUTION

以下の step 25 から step 29 は迅速に、Vworks ソフトウェアの指示が表示されたらすぐに実施しなければなりません。自動化システムのそばを離れないようにしてください。自動化システムとサーマルサイクラの間で移動をする際、サンプルの温度が 65°C に保たれることが非常に重要です。

25. ワークステーションが Capture Library と Hybridization Buffer マスターミックスの分取が完了すると VWorks に以下の指示が表示されます。サーマルサイクラが 65°C、Hold のステップになっていることを確認し(まだ Hold になっていなかったら、Hold になるまで待ってから) **Continue** をクリックします。プレートを動かすように指示があるまでは、サーマルサイクラにサンプルプレートを入れておいてください。



26. VWorks に以下の指示が表示されたら、迅速にサンプルプレートをサーマルサイクルから取り出し、Bravo デッキ 4 番の赤いアルミニウムインサートの上に載せてください。溶液が飛び散らないようにシールを剥がし、**Continue** をクリックします。



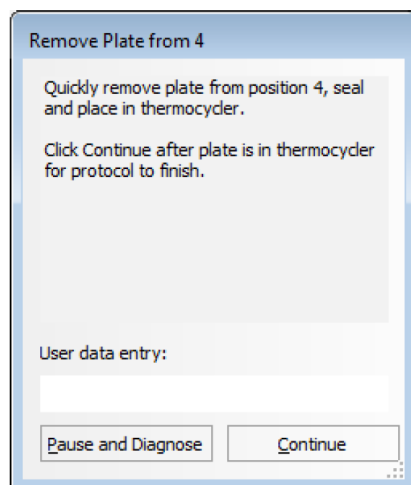
WARNING

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。

自動化システムは DNA サンプルとブロッキング試薬の混合液を含む PCR プレーートのウェルに、キャプチャライブラリとハイブリダイゼーションバッファの混合液を移します。

27. VWorks に以下の指示が表示されたら、迅速に Bravo デッキ4番から PCR サンプルプレート（赤いアルミニウムインサート）を残したまま取り出します。



28. サンプルプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、3 秒です。
29. すぐにプレートをサーマルサイクラに戻し、65°Cで保温します。Play ボタンを押し、設定したプログラムのハイブリダイゼーション segment (p76、表 39 の segment4)を開始します。このステップで、調製した DNA サンプルは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の温度は高く、やけどする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

30. サーマルサイクラでハイブリダイゼーションを開始したら、VWorks スクリーンの **Continue** をクリックします。
31. VWorks プロトコルを終了させるため、**Unused Tips** と **Empty Tip box** ダイアログボックスの **Continue** をクリックし、その後 **Protocol Complete** ダイアログボックスの **Yes** をクリックします。

STEP3. ハイブリダイズした DNA のキャプチャと洗浄

このステップでは自動化システムの SSEL Capture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst ランセットを使用し、ストレプトアビジン結合ビーズを使って DNA とキャプチャライブラリのハイブリッドをキャプチャします。キャプチャと洗浄のプロトコルのセットアップ(以下の step1 から p. 91 の step16 まで)は p. 87 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のためのインキュベーションの間(約 1.5 時間)に完了してください。

キャプチャと洗浄のランセットでは表 49 に示す試薬を使用します。

表 49 キャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	p. 89
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	p. 90
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	p. 90
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Follow storage recommendations provided by supplier (see on page)	p. 89

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 66°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
4. 赤いアルミニウムインサートを Bravo デッキ 4 番におきます。
5. Bravo デッキ 6 番に Nunc DeepWell プレート用のシルバーインサートをおきます。このインサートはキャプチャと洗浄の間 DeepWell ソースプレートへ熱伝導を促進するために必要です。シルバーインサートにソースプレートをセットする際には、適切に熱が伝わるようプレートが正しくセットされているか確認してください。

Dynabeads streptavidinビーズの準備

6. 保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気ビーズをボルテックスミキサでよく攪拌し再懸濁します。
7. 磁気ビーズを以下の手順で洗浄します。
 - a. コニカルチューブに表 50 に示す試薬を混合します。液量は余剰分を含みます。

表 50 磁気ビーズ洗浄に使用する試薬

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 µl	425 µl	825 µl	1225 µl	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. ボルテックスミキサで 5 秒攪拌します。
 - c. Dynal magnetic separator (Invitrogen Dynamag-15 または-50)等のマグネットにチューブをセットします。
 - d. 上清を取り除き廃棄します。
 - e. step a から d までの洗浄を合計 3 回繰り返します。(各洗浄ではビーズを残し、表に示した量の SureSelect Binding Buffer を新しく分注し混合します。)
8. 表 51 に従い、SureSelect Binding Buffer にビーズを再懸濁します。

表 51 SSELCAapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst 用の磁気ビーズの調製

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

9. 洗浄したストレプトアビジンビーズを Nunc DeepWell ソースプレートに分注します。Nunc DeepWell プレートの使用する各ウェルに 200 µL の均一なビーズ懸濁液を加えます。使用するサンプル数に合わせて、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てください。
10. ストレプトアビジンビーズが入ったソースプレートを Bravo デッキ 5 番におきます。

キャプチャと洗浄溶液ソースプレートの調製

11. 15 mL の Nuclease-free water を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
12. Wash #1 と書いた Eppendorf twin.tec ソースプレートを準備します。使用する各ウェルに 160 μ L の SureSelect Wash Buffer 1 を加えます。
13. Wash #2 と書いた Nunc DeepWell ソースプレートを準備します。使用する各ウェルに 1150 μ L の SureSelect Wash Buffer 2 を加えます。

ワークステーションの準備

14. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 52 に従い Labware MiniHub にプレート等をセットします。

表 52 SSELCAapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst 用の MiniHub の初期配置

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

15. 表 53 に従い Bravo デッキにプレート等をセットします(デッキ 5 番には既にセットされています)。

表 53 SSELCAapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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. 表 54 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 54 SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst 用の BenchCel 初期配置

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

SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rstの実行

サーマルサイクラのプログラムが segment5 の 65°C Hold ステップに到達している状態、p. 87 でスタートしたハイブリダイゼーションのインキュベートが完了後(約 1 時間)、SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst ランセットをスタートします。

SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst ランセットの実行には約 2 時間かかります。オペレーターは下表に示す 2 つの作業をランセットの間に行う必要があります。表の時間は目安です。各作業はランセット中の適切なときに VWorks から指示が表示されるので、その時点で行ってください。

表 55

作業内容	ラン開始後の目安時間
ハイブリダイゼーション溶液を サーマルサイクラからワークステーションへ移す	<5 minutes
PCRプレートを読みアルミニウムインサートから 取り除く	5-10 minutes

17. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の

SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst を選択します。

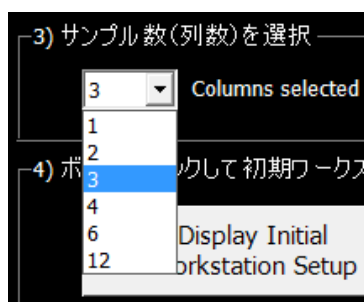


4. ハイブリダイゼーション

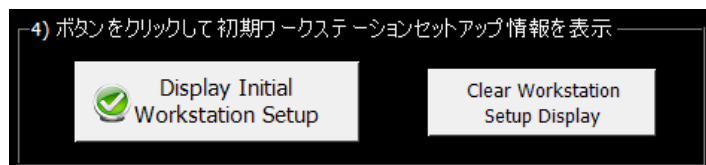
18. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」でハイブリダイゼーションに使用した PCR プレートを選択してください。このプレートは VWorks に指示が表示されたら、サーマルサイクラから Bravo デッキ 4 番にセットします。



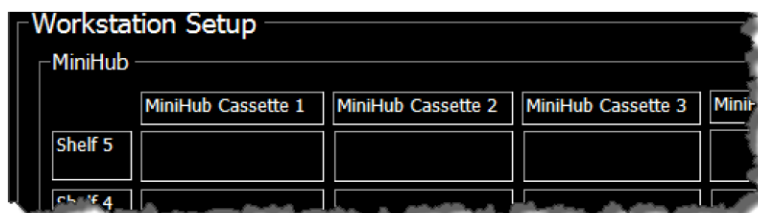
19. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



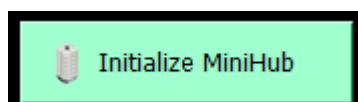
20. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



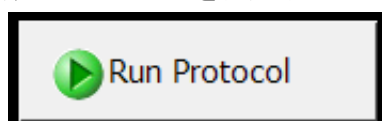
21. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



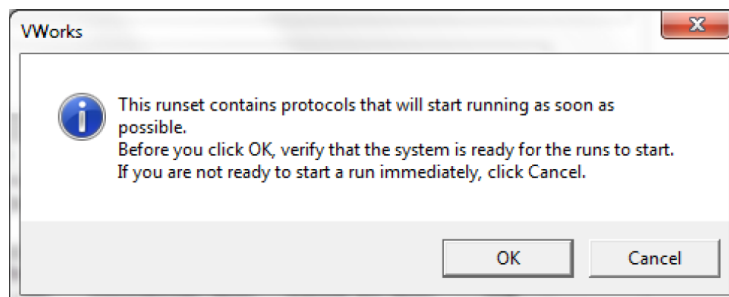
22. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。



23. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



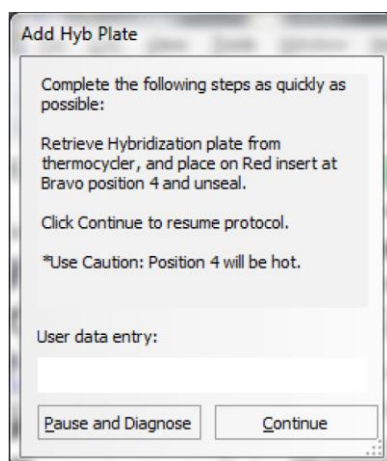
24. ランを開始する準備が整ったら以下に示すウィンドウの OK をクリックします。Bravo デッキ 4 番の温度が 66°C に事前にセットしてない場合は、デッキ 4 番がその温度に達しないとランは開始されません。数分後に操作が必要なので、自動化システムのそばを離れないようにしてください。



CAUTION

次の step 25 を迅速かつ注意深く行うことが重要です。サンプルプレートの温度を 65°C に保ったまま素早く Bravo に移します。プレートのシールをはがす際にサンプルが飛び散るのを防ぐため、傾けたり急に動かしたりしないでください。サンプルプレートを Bravo デッキに移す前にデッキの温度と試薬の位置が正しくセットされ、自動化システムの準備が完了していることを確認してください。

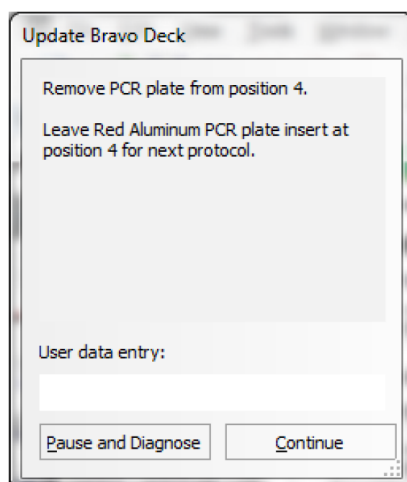
25. 以下に示す指示が VWorks に表示されたら、65°C に維持されているハイブリダイゼーション反応液が入った PCR プレートをサーマルサイクルから取り出し、素早く Bravo デッキ 4 番の赤いアルミニウムインサートにセットします。溶液が飛び散らないように注意してシールを剥がし、ランセットを再開させるために **Continue** をクリックします。



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. 以下に示す指示が VWorks に表示されたら、Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを取り除きます。赤いアルミニウムインサートは載せたままにしておきます。完了したらランセットを再開させるため、**Continue** をクリックします。



SSELCapture&Wash_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.rst ランセットの残りの工程は約 1.5-2 時間かかります。ランセットが完了後、キャプチャされビーズに結合した DNA サンプルは Bravo デッキ 9 番に Eppendorf プレートに入った状態になります。

ランセットが完了したら PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートにシールします。設定は 165°C、1 秒です。プレートは次の自動化プロトコルのセットまで氷上に置いておきます。

NOTE

キャプチャされた DNA はキャプチャ後の増幅ステップの間、ストレプトアビジンビーズに吸着しています。



5. マルチプレックスシーケンスのための キャプチャ後サンプル調製

- STEP1. キャプチャライブラリの増幅 96
- STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅したキャプチャ
後ライブラリの精製 102
- STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認 105
- STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプ
ルのプール 114
- STEP5. シーケンスサンプルの調製 116
- STEP6. シーケンスの開始とデータ解析 118

この章では、キャプチャしたライブラリを増幅、精製、品質確認と定量を行う工程を示しています。マルチプレックスシーケンスのために、インデックスと分子バーコードが含まれるサンプルをプールする内容も含まれています。



STEP1. キャプチャライブラリの増幅

このステップでは、自動化システムは SureSelect で濃縮された DNA サンプルの PCR 増幅のための調製を行います。PCR プレートをワークステーションで準備後、増幅のためにサーマルサイクラにプレートを移す必要があります。

キャプチャライブラリのサイズにより、増幅のサイクル数が異なります。同じプレートには同じようなサイズのキャプチャライブラリを使用しサンプルの増幅を行えるよう、実験計画を立ててください。推奨のサイクル数は p97 の表 58 を参照にしてください。

このステップでは表 56 に示す試薬を使用します。実験を始める前に表に記載されている試薬を溶解し氷上におきます。各試薬は使用前に表に従って混合してください。

表 56 キャプチャ後 PCR 増幅で使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	p. 98
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	p. 98
100 mM dNTP Mix (green cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	p. 98
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	p. 98

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、PCR マスターミックスはラボで決められたクリーンエリアもしくは UV 滅菌灯を備えた PCR フード内で陽圧の環境下で調製してください。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。
2. DNAAway decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. チラーの電源を入れ、0°Cに設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25%エタノールがあることを確認してください。

4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番と 6 番の温度を 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に、デッキ 6 番は CPAC 2 2 に相当します。

サーマルサイクラの準備

5. 表 57 のプログラムをサーマルサイクラに設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおして蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 57 キャプチャ後 PCR 増幅サーマルサイクラのプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	9 to 14 キャプチャライブラリサイズに基づいた 推奨のサイクル数については 表 58 をご覧ください	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

*サーマルサイクラのプログラムでの反応量は 50 µL に設定してください。

表 58 キャプチャ後 PCR サイクル数の推奨

Capture Library Size/Description	Cycles
Libraries <0.2 Mb	14 cycles
Libraries 0.2–3 Mb (includes SSeI XT HS and XT Low Input ClearSeq Comp Cancer)	12 cycles
Libraries 3–5 Mb	10 cycles
Libraries >5 Mb (includes SSeI XT HS and XT Low Input Human All Exon V6 and Clinical Research Exome V2 libraries)	9 cycles

キャプチャ後PCRマスターミックスとマスターミックスソースプレートの調製

6. 表 59 に従い、適切な量のキャプチャ後 PCR マスターミックスを調製します。ボルテックスミキサでよく混合し氷上に置いておきます。

表 59 キャプチャ後 PCR マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	12.5 µl	159.4 µl	265.6 µl	371.9 µl	478.1 µl	690.6 µl	1328.1 µl
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µl	127.5 µl	212.5 µl	297.5 µl	382.5 µl	552.5 µl	1062.5 µl
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µl	6.4 µl	10.6 µl	14.9 µl	19.1 µl	27.6 µl	53.1 µl
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 µl	12.8 µl	21.3 µl	29.8 µl	38.3 µl	55.3 µl	106.3 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	12.8 µl	21.3 µl	29.8 µl	38.3 µl	55.3 µl	106.3 µl
Total Volume	25 µl	318.8 µl	531.3 µl	743.8 µl	956.3 µl	1381.3 µl	2656.3 µl

7. 表 60 に示す容量の PCR マスターミックスを新しい Nunc DeepWell プレートのカラム 1 の全てのウェルに加え、マスターミックスソースプレートを調製します。

表 60 Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用のマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
PCR Master Mix	Column 1 (A1-H1)	36.0 µl	62.0 µl	88.0 µl	114.0 µl	166.0 µl	322.0 µl

8. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は 165°C、1 秒です。
9. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし気泡を除きます。

ワークステーションの準備

10. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 61 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 61 Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用の MiniHub の初期配置

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

11. 表 62 に従い Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 62 Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
4	Captured DNA bead suspensions in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)
9	Master mix plate containing PCR Master Mix in Column 1 (unsealed) seated on silver Nunc DeepWell insert

12. 表 63 に従い BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 63 Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.proの実行

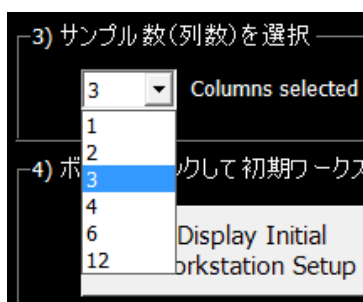
13. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の **Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro** を選択します。



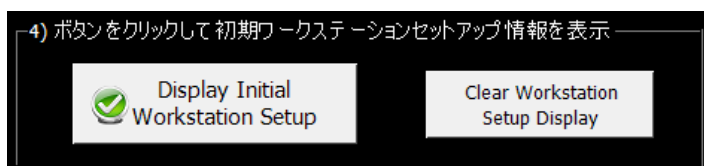
14. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」で Bravo デッキ 6 番にセットした PCR プレートを選択してください。



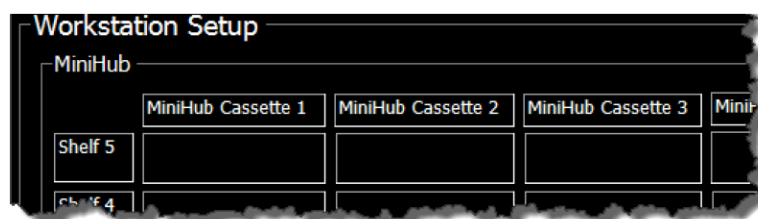
15. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



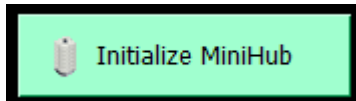
16. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



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



18. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

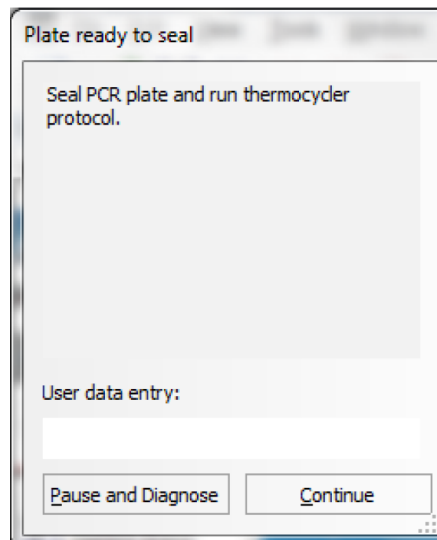


19. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



Post-CapPCR_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro の実行には約 15 分かかります。完了するとキャプチャされた DNA と PCR マスターミックスを含み、PCR にかけるサンプルは Bravo デッキ 6 番の PCR プレートに入った状態になります。

20. 以下の指示が表示されたら Bravo デッキ 6 番から PCR プレートをとり、PlateLoc Thermal Microplate Sealer で 165°C、3 秒でシールします。



21. プレートをサーマルサイクラに移し、Play ボタンを押し、p97、表 57 のプログラムをスタートします。

22. PCR 増幅プログラムが完了したら、プレートをスピンドウンし氷上に置きます。

次のステップで Agencort AMPure XP ビーズを使用するので、使用前に室温に戻しておきます。

STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅したキャプチャ後ライブラリの精製

このステップでは自動化システムで AMPure XP ビーズと増幅した DNA を Nunc DeepWell プレートに移し、ビーズに結合した DNA を集め洗浄する操作を実行します。

ワークステーションの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel にあるプレートやチップボックスを全て片付けます。
2. DNA Away decontamination wipe で Labware MiniHub, Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 45°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
4. チラーの電源を入れ、0°C に設定します。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーに少なくとも 300 mL の 25% エタノールがあることを確認してください。
5. 使用する少なくとも 30 分以上前に AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。
6. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
7. 均一にした状態にした AMPure XP ビーズ懸濁液 55 µL を Nunc DeepWell 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合わせて、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。
8. 15 mL の Nuclease-free water を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
9. 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。
10. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 64 に従い Labware MiniHub にプレート等をセットします。

表 64 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Post-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	—	—	—
Shelf 4	—	—	—	—
Shelf 3	—	Empty Eppendorf twin.tec Plate	—	—
Shelf 2	—	Nuclease-free water reservoir from step 7	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 6	—
Shelf 1 (Bottom)	—	70% ethanol reservoir from step 8	—	Empty tip box

11. 表 65 に従って Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 65 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	Amplified DNA libraries in unsealed PCR plate seated in red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

12. 表 66 に従って BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 66 AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.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	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	2 Tip boxes	—	—	—
4	2 Tip boxes	—	—	—
6	3 Tip boxes	—	—	—
12	6 Tip boxes	—	—	—

AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Post-Capture PCRの実行

13. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の

AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Post-Capture PCR を選択します。



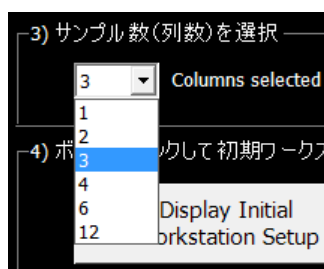
NOTE

AMPure XP 精製プロトコルは、SureSelect 自動化システムの複数のステップで使用します。自動化プロトコルを開始する際に正しいワークフローのステップを選択しているか確認してください。

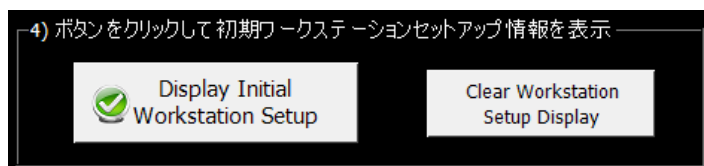
14. 「サーマルサイクラーで使用する PCR プレートタイプを選択」で Bravo デッキ 9 番にセットした PCR プレートを選択してください。



15. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



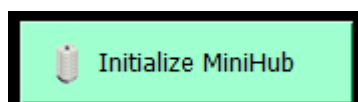
16. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



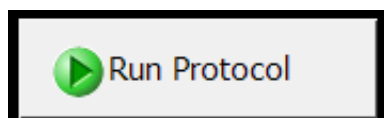
17. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



18. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。



19. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



精製プロトコルの実行には約 45 分かかります。完了すると精製された DNA サンプルは Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートに入った状態になります。

STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認

サンプル解析は自動化サンプル調製プログラムを使用して Agilent 4200 TapeStation で行うか、手作業でサンプル調製を行い 2100 バイオアナライザで行います。

どの装置を使用する解析においても試薬類を使用前に室温に 30 分置き、完全に室温に戻してください。

Option1: Agilent 4200 TapeStationとHigh Sensitivity D1000アッセイを使用する場合

ここでは 2 µL の DNA サンプルと 2 µL の High Sensitivity D1000 Sample buffer を混合し、High Sensitivity D1000 アッセイ用サンプルプレートで自動化プロトコル TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro を用いて調製します。調製後、アッセイプレートを 4200 TapeStation に移し解析を行います。詳細は別途 High Sensitivity D1000 Kit のマニュアルをご参照ください。

NOTE

必要に応じて、手作業でアッセイ用サンプルプレートを調製することができます。その際はガイドに従ってください。Electropherogram の解析は p. 109 のガイドラインをご参照ください。

ワークステーションとSample Bufferソースプレートの準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスを片付けます。
2. DNAAway decontamination wipe で Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。
3. Bravo デッキの 9 番を室温に戻すためチラーの電源を切ります (p. 21 参照)。
4. Bravo デッキヒートブロックの温度設定を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使って Bravo デッキ 4 番の温度を 4°C に設定してください。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。
5. Hyb_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro のランに使用した Eppendorf twin.tec プレートを使用し、Sample Buffer ソースプレートを室温で調製します。表 67 に従い、カラム 4 の各ウェルに High Sensitivity D1000 Sample Buffer を加えます。Sample Buffer ソースプレートの最終的な配置は図 15 に示します。

表 67 TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro 用の Sample Buffer プレートの調製

Solution	Position on Source Plate	Volume of Sample Buffer added per Well of Eppendorf twin.tec Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
High Sensitivity D1000 Sample Buffer	Column 4 (A4-H4)	7.0 µl	9.0 µl	11.0 µl	13.0 µl	17.0 µl	29.0 µl

5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

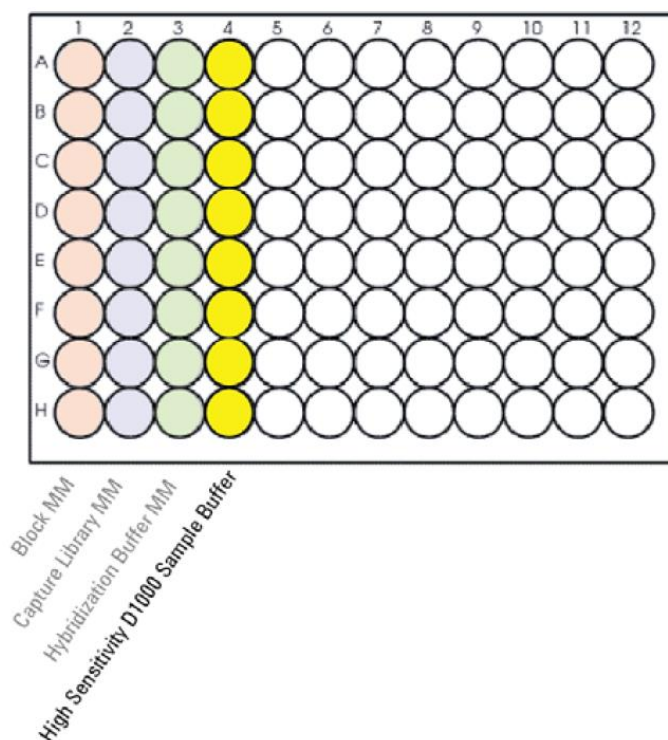


図 15 TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro 用の Sample Buffer ソースプレートの配置。
1-3 のカラムはハイブリダイゼーションのプロトコルのマスターミックスで使用されています。

ワークステーションの準備

6. 図 4 に示すプレートの向きを参照に、表 68 に従い Labware MiniHub にチップボックスをセットします。

表 68 TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro 用の MiniHub の初期配置

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

7. 表 69 に従い、Bravo デッキにプレート等をセットします。

表 69 TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro 用の Bravo デッキ初期配置

Location	Content
4	Amplified post-capture libraries in Eppendorf twin.tec plate (unsealed)
6	Empty Eppendorf twin.tec plate
9	Eppendorf twin.tec source plate containing High Sensitivity D1000 Sample Buffer in Column 4

CAUTION

Agilent 4200 TapeStation と自動化システムへのダメージを避けるため、アッセイプレートの調製の自動化には指定の Eppendorf twin.tec プレート (Eppendorf p/n 951020401 または 951020619) のみ使用してください。自動化プロトコルで調製したサンプルプレートを 2200 TapeStation の解析には使用しないでください。

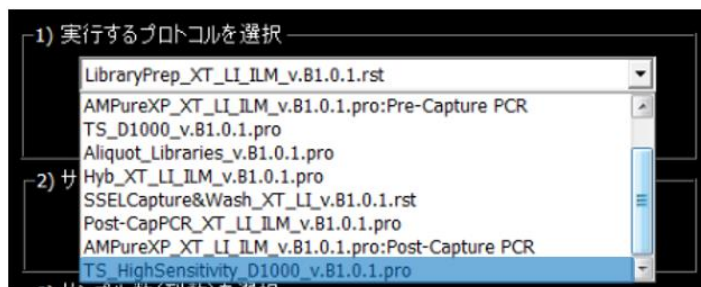
8. 表 70 に従い、BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 70 TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro 用の BenchCel 初期配置

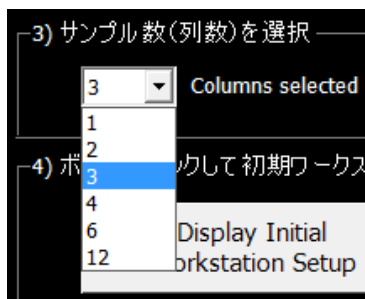
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	—	—	—
2	1 Tip box	—	—	—
3	1 Tip box	—	—	—
4	1 Tip box	—	—	—
6	1 Tip box	—	—	—
12	1 Tip box	—	—	—

TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.proの実行

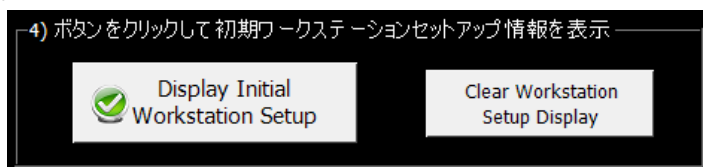
9. セットアップフォームの「実行するプロトコルを選択」の **TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro** を選択します。



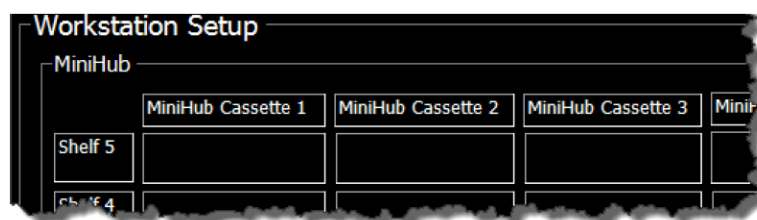
10. 「サンプル数(列数)を選択」から使用するカラム数を選択します。1, 2, 3, 4, 6 または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。



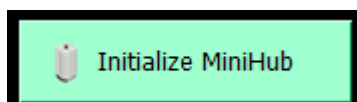
11. Display Initial Workstation Setup をクリックします。



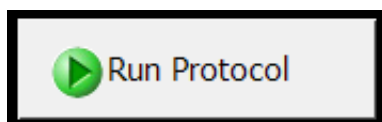
12. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



13. MiniHub の電源が入っていることを確認し、イニシャライズします。

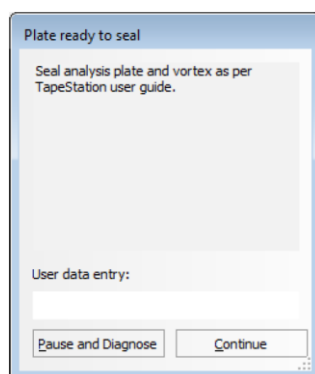


14. 確認後、Run Protocol をクリックしてください。



TS_High Sensitivity D1000_v.B1.0.1.pro の実行には約 15 分かかります。解析用のサンプルを分取が完了後、Bravo デッキ 4 番にある DNA ライブラリサンプルプレートをしールし、p. 114 のシーケンスのためサンプルをプールするまで氷上に置きます。

15. 以下の指示が表示されたら、Bravo デッキ 6 番にある解析用サンプルが入った Eppendorf twin.tec プレートを取り出し、**Continue** をクリックしてください。High Sensitivity D1000 アッセイプレートを Foil Seal でしールし、ユーザーガイドに従ってボルテックスミキサで混合してください。



CAUTION

4200 TapeStation へのダメージを避けるため、指定の 96-well plate foil seals (Agilent p/n 5067-5154)のみを使用してください。

正確な定量のため、DNA と Sample buffer はボルテックスミキサで 1 分間混合し、完全に混合されていることを確認してください。その後、液を集めるためスピンドウンをしてください。

High Sensitivity D1000アッセイでの泳動とデータの解析

16. ユーザーガイドに従い、解析用サンプルプレート、High Sensitivity D1000 ScreenTape、Loading tips を装置にセットしてください。泳動を開始します。
17. 解析終了後、電気泳動図(electropherogram)により、約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 16(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 17(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 18(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。
18. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

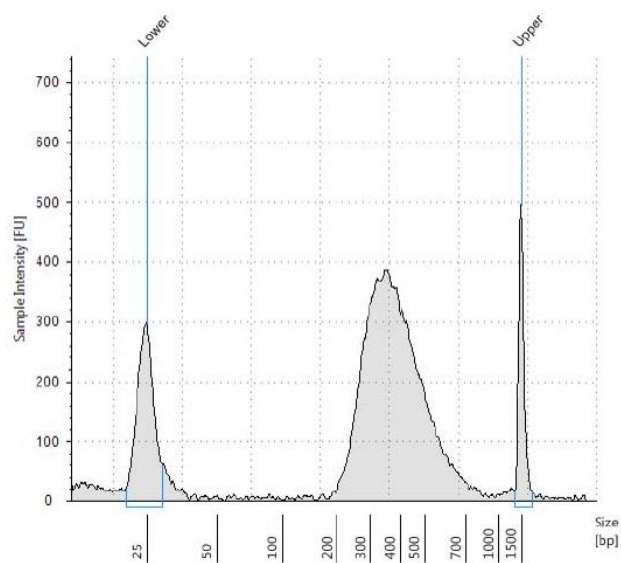


図 16 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity D1000 アッセイ)

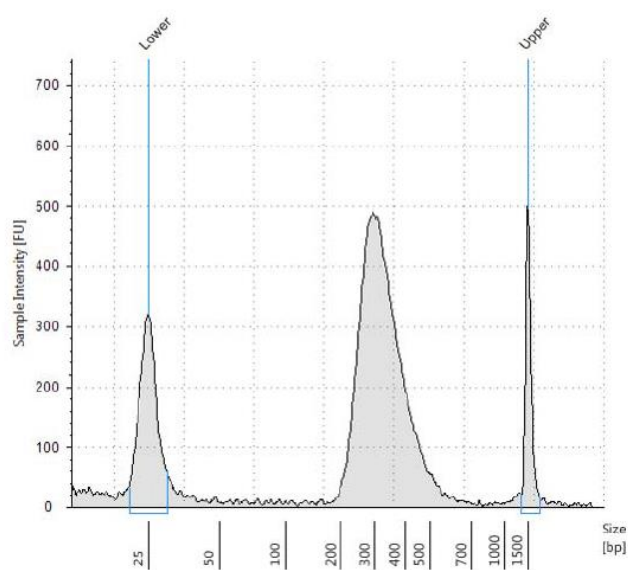


図 17 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity D1000 アッセイ)

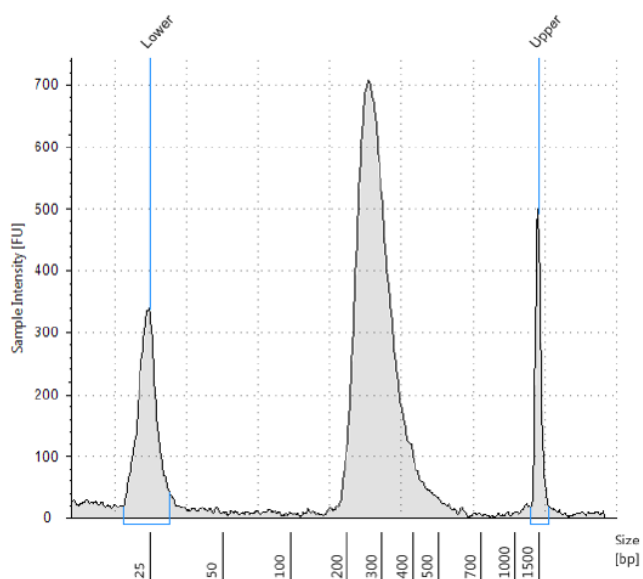


図 18 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity D1000 アッセイ)

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし-20℃で保存してください。

Option2: Agilent 2100バイオアナライザとHigh Sensitivity DNA1000アッセイを使用する場合

High Sensitivity DNA1000 試薬キットと High Sensitivity DNA チップを使用します。詳細は別途 High Sensitivity DNA1000 Kit のマニュアルをご参照ください。

1. Kit のマニュアルに従い、2100 バイオアナライザをセットアップします。
2. Kit のマニュアルに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。各サンプル 1 μ L をアッセイに用います。
3. チップ調製後 5 分以内に装置にセットし、泳動を開始してください。
4. 解析終了後、電気泳動図(electropherogram)により、約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 19(高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 20(中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 21(低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)に示されています。
5. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。より高精度に定量するために、濃度が解析試薬の定量範囲内であることを確認してください。

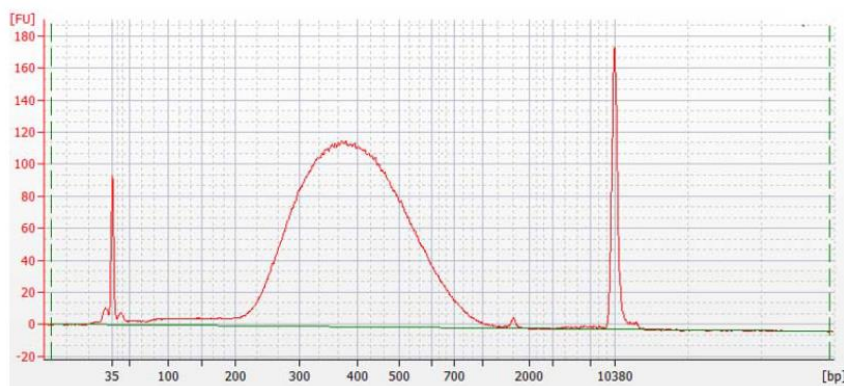


図 19 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity DNA アッセイ)

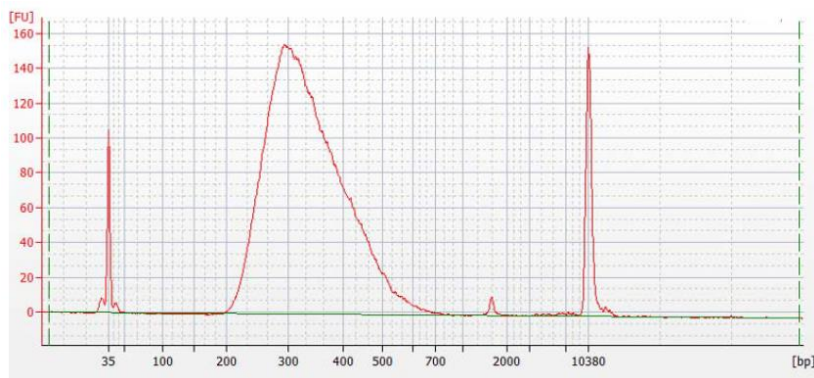


図 20 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity D1000 アッセイ)

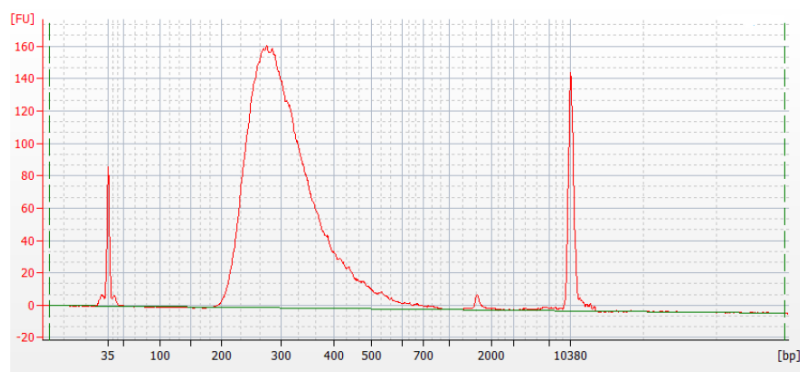


図 21 低品質な gDNA サンプルから調製したキャプチャ後ライブラリの電気泳動図
(High Sensitivity D1000 アッセイ)

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルプレートをシールし-20℃で保存してください。

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

1 つのシーケンスレーンにマルチプレックスできるインデックスライブラリの数や、研究デザインに必要なシーケンス量は、使用するプラットフォームの仕様により異なります。1 レーンあたりのマルチプレックス数は、使用するプラットフォームのキャパシティや、1 サンプルあたりに必要とするシーケンスデータ量により異なりますので、必ずイリミナ社の提供する最新のプロトコルをあわせて参照してください。

以下の手順に従い、各インデックスサンプルがプール中で等モル量になるように、ライブラリを混合します。

方法 1: プールするサンプルそれぞれを、1X Low TE を用いて終濃度が同じになるように希釈します（典型的な濃度は 4 nM-15 nM。もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます）。その後、全てのサンプルを同じ容量混合して、最終的なプールを調製します。

方法 2: プールするサンプルは異なる濃度のまま、それぞれ適切な量を混合して、最終的にプール中で等モル量になるようにします。その後、プールを 1X Low TE を用いて必要とされる容量にします。以下の式はプールに加える各インデックスサンプルの量を計算するための式です。

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

$V(f)$: プールされたサンプルの最終的な必要量

$C(f)$: プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

(典型的な濃度は 4 nM-15 nM。もしくは最も濃度が低いサンプルに合わせます。)

$\#$: プールするインデックスの数

$C(i)$: 各インデックスサンプルの初期濃度

表 71 に 4 種のインデックスサンプル(それぞれ異なる初期濃度)の量と、最終的に 20 μ L の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

表 71 10 nM の濃度でトータル 20 μ L に調製する計算例

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

STEP5. シーケンスサンプルの調製

最終的な SureSelect XT Low Input ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な Pair-end プライマーとケミストリでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 22 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

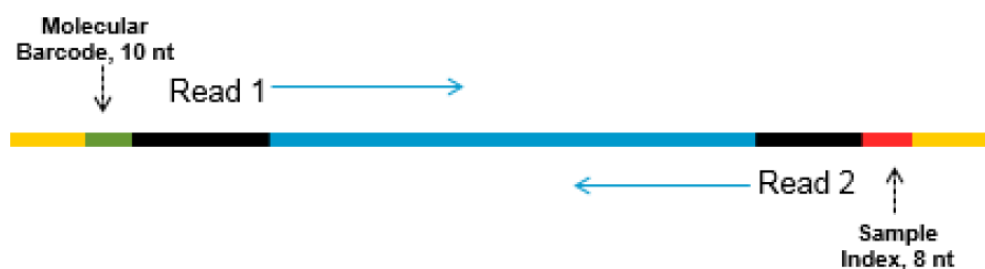


図 22 SureSelect XT Low Input シーケンスライブラリの構造。

各断片は 1 つのターゲットインサート(青)はイルミナ pair-end シーケンスエレメント(黒)とサンプルインデックス(赤)、分子バーコード(緑)、ライブラリブリッジ PCR プライマ(黄)が付加されています。

ライブラリはイルミナ社 HiSeq、MiSeq、NextSeq プラットフォームでシーケンスすることができます。使用するランタイプとケミストリの組み合わせは表 72 をご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT Low Input ライブラリを HiSeq2500 で high-output run モード(v4 ケミストリ)でシーケンスした場合、分子バーコードの質が低くなることを確認しています。Q score が低くなるとカバレッジやバリエーションコールの感度に影響することがあります。特に頻度 10%以下の変異に対して顕著です。詳細は Agilent Technical Support にお問い合わせください。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスタ増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は表 72 に示されています。

SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチライブラリに最適なシーディング濃度は、使用するシーケンスプラットフォーム、ランタイプ、イルミナ社キットのバージョンにより異なります。ガイドラインについては表 72 を参照してください。シーディング濃度とクラスタ濃度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、求められるアウトプットやデータの質に基づき、最適化が必要な場合もあります。

より良好なシーケンス QC のための低濃度のスパイクインによる PhiX コントロールにつきましては、イルミナ社の推奨に従ってください。

表 72 イルミナ社キット選択ガイドライン

Platform	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry	Seeding Concentration
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	4×50 Cycle Kits [*]	v3	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output [†]	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	12–14 pM
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4×50 Cycle Kits [*]	v3	6–9 pM
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	8–12 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2	9–10 pM
MiSeq	All Runs	2 × 75 bp	150 Cycle Kit	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2	1.5–1.8 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1	180–190 pM

^{*} 1 つの 200 cycle kit では 8 bp の i7 と 10 bp の i5、Read1 と 2 を完全にシーケンスする十分量の試薬が含まれません。必要に応じて 1 つの 200 cycle kit と 50 cycle kit を使用しリードを追加してください。

[†] HiSeq2500 で high-output run モード(v4 ケミストリ)でシーケンスした場合、分子バーコードの Q score が低くなることが確認されています。詳細は Agilent Technical Support にお問い合わせください。

STEP6. シーケンスの開始とデータ解析

以下のガイドラインに従い SureSelect XT Low Input ライブラリのシーケンスセットアップと解析を実施してください。

サンプルレベルインデックス (i7) には 8 bp のインデックスリードが必要です。i7 のインデックス塩基配列情報については、p. 130 の表 84 と表 85 をご参照ください。

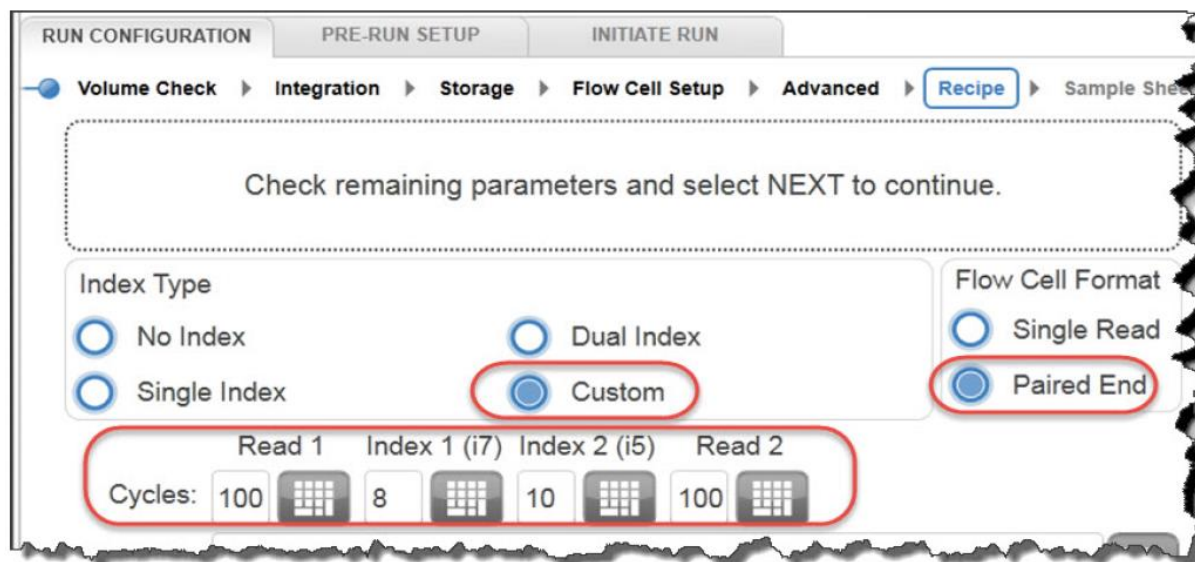
CAUTION

SureSelect XT Low Input Index Primer 1-96 と 97-192 の 8 bp のインデックス塩基配列は、Agilent SureSelect XT システムのインデックスプライマー A01-H12 の 8 bp インデックス塩基配列とは異なります。

- ・ 分子バーコード (i5) には 10 bp のインデックスリードが必要です。すべてのサンプルの i5 degenerate molecular barcode の項目に NNNNNNNNNN を入力してください。
- ・ HiSeq と NextSeq プラットフォームでは、装置のユーザインターフェースからランのセットアップを行いません。p. 119 のガイドラインに従ってください。
- ・ MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM) を用いてランのセットアップを行いません。p. 120-p. 121 に記載されている手順に従い、カスタムサンプルシートを作成します。
- ・ リードをリファレンスゲノムに対してアラインメントする前に、リードからイルミナ社アダプター配列を除去する必要があります。Agilent の SureCall ソフトウェアでその作業を行なうことができます。その情報については p. 122 をご参照ください。

【HiSeq・NextSeqプラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン】

装置のコントロールソフトウェアの画面からシーケンスのランセットアップを行ないます。以下は、HiSeq プラットフォームでの 100+100 bp のペアエンドシーケンスのランセットアップの例です。



NextSeq プラットフォームをお使いの場合は、Run Setup スクリーンで同じパラメータを確認し、上記の HiSeq の例に示された内容を設定してください。現在 BaseSpace では分子バーコードをインデックスリードとしてシーケンスすることをサポートしておりません。スタンドアローンモードで NextSeq のランを設定してください。

bcl2fastq ソフトウェアを使用して FASTQ ファイルを作成するには、**mask-short-adaptor-reads** の値を 0 に設定して following base mask を Y*, I8, Y10, Y* に設定する必要があります。

【MiSeqプラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン】

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM) ソフトウェアを用いてカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT Low Input インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT Low Input システムのインデックス塩基配列につきましては、p. 130-p. 131 の表 84 と表 85 を参照してください。

カスタムSample Sheetのセットアップ

1. IEM ソフトウェア中で、以下の Workflow を選択し、MiSeq プラットフォームの Sample Sheet を作成します。
 - ・ **Category** から Other を選択
 - ・ **Application** から FASTQ Only を選択
2. **Workflow Parameters** 画面上で、ラン情報を入力し、下図でハイライトしているキーとなるパラメータが、下図の内容になっていることを確認します。

Cycles Read 1 と Cycles Read 2 は、リード長 100 bp の場合は 101 を入力します。FASTQ Only Workflow-Specific Setting チェックボックスは全てはずします。「Use Adapter Trimming」「Use Adapter Trimming Reads 2」の両方のアダプタトリミングチェックボックス(下図、赤で囲まれている部分)ははずします(デフォルトではチェックされています)。

3. **Sample Sheet Wizard** を使用して、シーケンスする各サンプルの必要な情報を入力して、New Plate をセットアップします。**I7 Sequence** カラムには、各サンプルをいずれかの Illumina の i7 インデックスに割り当てます。インデックスは後のステップで SureSelect XT Low Input インデックスに変更します。同様に、**I5 Sequence** カラムにも、いずれかの Illumina の i5 インデックスに割り当てます。インデックスは後のステップで分子バーコードとして入力内容を変更します。



4. Sample sheet セットアップタスクを終了し、sample sheet file を保存します。

SureSelect XT Low Inputのインデックスと分子バーコードを含めるためのSample Sheetの編集

1. Sample sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、コラム 5-8 の i7、i5 のインデックス情報を変更します（下図、黄色くハイライトされた部分）。
 - 5 番目の **I7_Index_ID** カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT Low Input のインデックス名を入力します。6 番目の **index** カラムには、適切な SureSelect XT Low Input のインデックス配列を入力します。SureSelect XT Low Input のインデックスの A01 から H12 の塩基配列について、p. 130- p. 131 の表 84 と表 85 をご覧ください。
 - 7 番目の **I5_Index_ID** のカラムには、すべてのサンプルに対して「MoIBC」と入力します。8 番目の **index2** カラムには、すべてのサンプルに対して、10 塩基の分子バーコードとして「NNNNNNNNNN」を入力します。

[Header]									
Investigator Name	NN								
Project Name	Sequencing Project A								
Experiment Name	Experiment 1								
Date	4/1/2017								
Workflow	GenerateFASTQ								
Assay	SureSelect.XT.HS								
Chemistry	SureSelect.XT.HS								
[Reads]									
	101								
	101								
[Settings]									
OnlyGenerateFASTQ	1								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	Sample_Project	Description
Sample 1	Sample1	Plate1	A01	A01	AACGTGAT	MoIBC	NNNNNNNNNN		
Sample 2	Sample2	Plate1	A02	A02	AAACATCG	MoIBC	NNNNNNNNNN		
Sample 3	Sample3	Plate1	A03	A03	AAACATCG	MoIBC	NNNNNNNNNN		

図 23 SureSelect XT Low Input ライブラリサンプルのシーケンスのための Sample sheet 例

2. 編集した Sample Sheet を MiSeq でランを行うために適切な場所に保存します。

MiSeqプラットフォームのシーケンスのランに必要な追加設定事項

初めて MiSeq にて SureSelect XT Low Input ライブラリのシーケンスをランする前に、MiSeq Reporter の設定をインデックスリードの FASTQ ファイルを出力する設定にしてください。一度変更すると、その設定は保存されますので、次のランでは再設定する必要はありません。

この設定を変更するには、**MiSeq Reporter.exe.config** ファイルを開き、**<appSetting>** タグの下に、**<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>** という 1 文を追加します。この変更を反映するために、装置を再起動してください。

NOTE

MiSeqDx プラットフォームをご使用の場合、MiSeq Reporter の設定を変更するために、装置を research モードに変更してご使用ください。もし、research モードへの変更が可能な装置の場合、dual boot configuration に対応したシステムへアップグレードが必要な可能性があります。

【データ解析リソース】

Agilent の SureCall NGS データ解析ソフトウェアは、SureSelect XT Low Input ライブラリから得られたシーケンスデータ解析を行うことができます（アダプタートリミング、リードのアラインメント、バリエーションコール）。ソフトウェアは下記ウェブサイトよりダウンロード可能で、無償で使用できます。

www.agilent.com/genomics/surecall

もし他のアラインメントやダウンストリームの解析のパイプラインをお使いの場合、アジレントから Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) を提供しています。これは、フレキシブルなコマンドラインインターフェースによる、Agilent SureCall の機能を有しており、今お使いのバイオインフォマティクスパイプラインと合わせてお使いいただけます。AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、HS もしくは HS 以外のデータについて、アダプターや低クオリティ塩基のトリミングと、duplicate リードの排除の機能を持ちます。このツールは、インハウスのバイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、さらにこのモジュールは、特に十分なコンピュータインフラ環境下で、AGeNT のアルゴリズムには関係ない様々な問題を解決するための IT サポートをお持ちの方へご使用をお願いしております。アジレントからは AGeNT に関するサポートは限られていますので、Agilent SureCall ソフトウェアのご使用がおすすめです。アジレントは、AGeNT と組み合わせたアップストリーム/ダウンストリームのサードパーティーの解析ツールは保証しておりません。このツールにつきまして、詳細は www.genomics.agilent.com 上、AGeNT のページをご覧ください。



6. Appendix: FFPE由来DNAサンプルの使用

FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更	124
FFPE サンプルの品質確認	124
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	125

この章では、FFPE サンプルからの DNA を用いる際、その分解度に基づいてプロトコルを一部変更する内容をまとめています。



FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更

FFPE サンプルをお使いの際に、プロトコルに変更を加える内容を表 73 に示します。

表 73 FFPE サンプルのためのプロトコル変更内容一覧

Workflow Step and page	Parameter	Condition for non-FFPE Samples	Condition for FFPE Samples
gDNA Sample Preparation p. 36	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
DNA input for Library Preparation p. 37	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity (p. 37 の表 11 と p. 38 の表 12 をご覧ください。)
DNA Shearing p. 40	Mode of DNA Shearing	2 × 120 seconds	240 seconds (continuous)
Pre-capture PCR p. 52	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing p. 125	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity (p. 125 の表 74 と表 75 をご覧ください。)

FFPE サンプルの品質確認

DNA の分解度は Agilent NGS FFPE QC Kit もしくは Agilent 4200 TapeStation/2200 TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape を用い確認できます。

Agilent NGS FFPE QC Kit は、qPCR ベースのアッセイにより DNA サンプルの分解度を確認します。このキットを用いて確認することにより、結果として、サンプル中の増幅可能な DNA の量を正確に測定することができ、インプット DNA の量を調整することができます。また、得られた $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解スコアを元に、他のプロトコル変更内容を決定します。

Agilent 4200 TapeStation/2200 TapeStation システムでは、Genomic DNA ScreenTape アッセイと組み合わせて、電気泳動により DNA Integrity Number (DIN) の値を算出することができ、インプット DNA 量やその他のプロトコル上の変更内容を決定します。

FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨

分解していない DNA サンプルを用いた場合、研究目的にあった必要なシーケンスアウトプット量を決定した後、FFPE DNA サンプルを用いる場合には、以下のガイドラインを参考にさらに追加で必要なシーケンスアウトプット量を確認してください。

ΔΔCqで品質を確認したサンプルの場合：

ΔΔCq DNA 分解スコアで品質を確認している場合は、表 74 のガイドラインをご参照ください。例えば、ワークフローにおいて必要とされるカバレッジを得るためには、分解していない DNA サンプルで 100 Mb のアウトプットが必要な場合、ΔΔCq DNA が 1 の FFPE サンプルで、同程度のカバレッジを得るためには、200-400 Mb のシーケンスアウトプットが必要となります。

表 74 FFPE 由来の DNA サンプルに関する推奨シーケンスアウトプット

ΔΔCq value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
<0.5	No extra sequencing output
between 0.5 and 2	Increase sequencing allocation by 2× to 4×
>2	Increase sequencing allocation by 5× to 10× or more

DINで品質を確認したサンプルの場合：

Genomic DNA ScreenTape アッセイの DIN の値で品質を確認している場合は、表 75 のガイドラインをご参照ください。例えば、ワークフローにおいて必要とされるカバレッジを得るためには、分解していない DNA サンプルで 100 Mb のアウトプットが必要な場合、DIN が 4 の FFPE サンプルで、同程度のカバレッジを得るためには、200-400 Mb のシーケンスアウトプットが必要となります。

表 75 FFPE 由来の DNA サンプルに関する推奨シーケンスアウトプット

DIN value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
≥8	No extra sequencing output
between 3 and 8	Increase sequencing allocation by 2× to 4×
<3	Increase sequencing allocation by 5× to 10× or more



7. リファレンス

クリファレンス、などリファレンス情報について記載されております。

キット内容 126

SureSelect XT Low Input インデックスの塩基配列 130

トラブルシューティングガイド 132

この章では、キットに含まれている試薬内容、インデックス配列、トラブルシューティング情報、プロトコルのクイックリファレンス、などリファレンス情報について記載されております。

キット内容

SureSelect XT Low Input Reagents には以下の内容が含まれています。

表 76 SureSelect XT Low Input Reagents [G9703A] (96 反応)

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit p/n
SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	–20°C	5500-0140
SureSelect XT Low Input Index Primers 1–96 for ILM (Pre PCR)	–20°C	5190-6444
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9687
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	–20°C	5190-9686

表 77 SureSelect XT HS Reagents [G9703B] (96 反応)

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit p/n
SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	–20°C	5500-0140
SureSelect XT Low Input Index Primers 97–192 for ILM (Pre PCR)	–20°C	5190-6445
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9687
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	–20°C	5190-9686



表 76 と表 77 の内容物の試薬コンテンツを以下に示します。

表 78 SureSelect XT Low Input Library Preparation Kit (Pre PCR) の内容

Kit Component	Format
End Repair-A Tailing Enzyme Mix	tube with orange cap
End Repair-A Tailing Buffer	bottle
T4 DNA Ligase	tube with blue cap
Ligation Buffer	bottle
Adaptor Oligo Mix	tube with white cap
Forward Primer	tube with brown cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer	tube with clear cap

表 79 SureSelect XT Low Input Index Primers Kit (Pre PCR) の内容

Kit Component	Index Primers 1-96 (p/n 5190-6444)	Index Primers 97-192 (p/n 5190-6445)
SureSelect XT Low Input Index Primers for ILM (reverse primers containing 8-bp index sequence)	Index Primers 1 through 96, provided in yellow plate (Index Plate 1)*	Index Primers 97 through 192, provided in red plate (Index Plate 2)†

* インデックス配列については、p. 130 の表 84 をご覧ください。

† インデックス配列については、p. 131 の表 85 をご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT Low Input Index Primer は 1 回分ずつが含まれています。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、1 つのライブラリ調製反応に使用した後の各バイアルは廃棄してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

表 80 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 1 (Post PCR) の内容

Kit Component	Format
SureSelect Binding Buffer	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle

表 81 SureSelect XT Low Input Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module box 2 (Post PCR) の内容

Kit Component	Format
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle
SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix	tube with blue cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap
SureSelect Post-Capture Primer Mix	tube with clear cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer	tube with clear cap

表 82 SureSelect XT Low Input Index Primers 1-96(黄色プレート、Index Plate1)の
プレート上の位置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

表 83 SureSelect XT Low Input Index Primers 97-192(赤色プレート、Index Plate2)の
プレート上の位置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	1110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

SureSelect XT Low Input インデックスの塩基配列

各インデックスは 8 塩基です。8 塩基のインデックスを用いたライブラリのシーケンスのランセットアップに必要な内容につきましては、p. 118 をご覧ください。

表 84 SureSelect XT Low Input Index Primers 1-96 (黄色プレート、Index Plate1) の配列情報

Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence
1	A01	GTCTGTCA	25	A04	CCGTGAGA	49	A07	ATGCCTAA	73	A10	ACAGCAGA
2	B01	TGAAGAGA	26	B04	GACTIONTA	50	B07	ATCATTCC	74	B10	AAGAGATC
3	C01	TTCACGCA	27	C04	GATAGACA	51	C07	AACTCACC	75	C10	CAAGACTA
4	D01	AACGTGAT	28	D04	GCTCGGTA	52	D07	AACGCTTA	76	D10	AAGACGGA
5	E01	ACCACTGT	29	E04	GGTGCGAA	53	E07	CAGCGTTA	77	E10	GCCAAGAC
6	F01	ACCTCCAA	30	F04	AACAACCA	54	F07	CTCAATGA	78	F10	CTGTAGCC
7	G01	ATTGAGGA	31	G04	CGGATTGC	55	G07	AATGTTGC	79	G10	CGCTGATC
8	H01	ACACAGAA	32	H04	AGTCACTA	56	H07	CAAGGAGC	80	H10	CAACCACA
9	A02	GCGAGTAA	33	A05	AAACATCG	57	A08	GAATCTGA	81	A11	CCTCCTGA
10	B02	GTCGTAGA	34	B05	ACGTATCA	58	B08	GAGCTGAA	82	B11	TCTTCACA
11	C02	GTGTTCTA	35	C05	CCATCCTC	59	C08	GCCACATA	83	C11	GAACAGGC
12	D02	TATCAGCA	36	D05	GGAGAACAA	60	D08	GCTAACGA	84	D11	ATTGGCTC
13	E02	TGGAACAA	37	E05	CGAACTTA	61	E08	GTACGCAA	85	E11	AAGGACAC
14	F02	TGGTGGTA	38	F05	ACAAGCTA	62	F08	TCCGTCTA	86	F11	ACACGACC
15	G02	ACTATGCA	39	G05	CTGAGCCA	63	G08	CAGATCTG	87	G11	ATAGCGAC
16	H02	CCTAATCC	40	H05	ACATTGGC	64	H08	AGTACAAG	88	H11	CCGAAGTA
17	A03	AGCAGGAA	41	A06	CATACCAA	65	A09	AGGCTAAC	89	A12	CCTCTATC
18	B03	AGCCATGC	42	B06	CAATGGAA	66	B09	CGACTGGA	90	B12	AACCGAGA
19	C03	TGGCTTCA	43	C06	ACGCTCGA	67	C09	CACCTTAC	91	C12	GATGAATC
20	D03	CATCAAGT	44	D06	CCAGTTCA	68	D09	CACTTCGA	92	D12	GACAGTGC
21	E03	CTAAGGTC	45	E06	TAGGATGA	69	E09	GAGTTAGC	93	E12	CCGACAAC
22	F03	AGTGGTCA	46	F06	CGCATACA	70	F09	CTGGCATA	94	F12	AGCACCTC
23	G03	AGATCGCA	47	G06	AGAGTCAA	71	G09	AAGGTACA	95	G12	ACAGATTC
24	H03	ATCCTGTA	48	H06	AGATGTAC	72	H09	CGACACAC	96	H12	AATCCGTC

表 85 SureSelect XT Low Input Index Primers 97-192(赤色プレート、Index Plate2)の配列情報

Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence	Index	Well	Sequence
97	A01	CCACACGA	121	A04	CTGTCAGT	145	A07	TCGAACGC	169	A10	GACCTCCT
98	B01	GACCACAC	122	B04	TCTAGTGT	146	B07	GCCTAAAT	170	B10	ACAAGGAC
99	C01	GTGCGACA	123	C04	GGATGATA	147	C07	CGTGATAA	171	C10	CCAAACCT
100	D01	GCTTCATG	124	D04	TACAGCGT	148	D07	TCCGCTGA	172	D12	CACCAGTT
101	E01	ACTAAGTC	125	E04	AGTACCGA	149	E07	GCTCATTG	173	E10	TGGACGAC
102	F01	CAGGAAAG	126	F04	GAGCCAAG	150	F07	AATCGATG	174	F10	GTTACAGC
103	G01	GATCCGCT	127	G04	AGCGACAT	151	G07	TTCCATCA	175	G10	GAACAATG
104	H01	GTATCAAC	128	H04	TTACCACC	152	H07	ATTCACAG	176	H10	CAATGACT
105	A02	TAGAGTCG	129	A05	AGACGCCA	153	A08	CGGAAAGA	177	A11	GCTCGAAC
106	B02	TCGACACT	130	B05	CATACTGG	154	B08	GTCAAGTG	178	B11	TCGGTAGC
107	C02	CTGACCTC	131	C05	CACGCATT	155	C08	CATCTTCA	179	C11	TACGAACT
108	D02	CATGGCTT	132	D05	TGGTCAAG	156	D08	GATAGGAT	180	D11	GCCGGATT
109	E02	GTACAGAT	133	E05	GACGGAAA	157	E08	CAAGTGGT	181	E11	TAGCTCGG
110	F02	TAGTGTTT	134	F05	AGTAGACT	158	F08	GCGTTACA	182	F11	TTGCCGGA
111	G02	ATCGAAAC	135	G05	TACAAAGG	159	G08	TATGCAAC	183	G11	GGTATGGT
112	H02	TCAAGTCA	136	H05	CGCAAGAT	160	H08	GAGACCGT	184	H11	TCACTAAG
113	A03	GGAACAAT	137	A06	TGTTGCAA	161	A09	TCGATGAA	185	A12	CCTCCCAT
114	B03	TAGCGAGT	138	B06	ATCAACGT	162	B09	TCAAAGAG	186	B12	GTTCTAGT
115	C03	TACCGAAG	139	C06	GACGACTG	163	C09	GTGGTATG	187	C12	GAGAAACC
116	D03	TAAGTCAC	140	D06	ACTGGACG	164	D09	CTGAGAAT	188	D12	CCTGTAAAT
117	E03	ATAACGTG	141	E06	TGATAACG	165	E09	TCTATCCG	189	E12	CCTTACCA
118	F03	GGTAGCTC	142	F06	ACATAGCG	166	F09	GCAATGTT	190	F12	ATGATAGG
119	G03	GAAGTACC	143	G06	ACACAAGG	167	G09	CACATAGC	191	G12	TATGGTGG
120	H03	CAACGTAT	144	H06	GAACGCTC	168	H09	TCCTGACC	192	H12	TGAGGAAT

トラブルシューティングガイド

サンプルからDNA精製する時にDNAの収量が少ない

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

キャプチャ前のライブラリの収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペティング・混合の特異的な説明が記載されています。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ PCR サイクル数は最適化が必要な場合があります。再度、そのサンプルについてはキャプチャ前PCR反応のサイクル数を1~2サイクル増やし、ライブラリ調製を試してください。ただし、収量の低いサンプルについて、電気泳動図(electropherogram)中に高分子量のピーク(>500 bp)が確認される場合、そのDNAは増幅過多である可能性が示唆されます。そのサンプルについては、キャプチャ前PCRのサイクル数を1~3サイクル減らしてください。
- ✓ FFPE組織サンプルを含む、分解しているサンプルから調製したDNAは、過度に分解している場合や、ライブラリ調製を阻害するような修飾をうけている場合があります。Agilent NGS FFPE QC Kitを使用して、サンプル中の増幅可能なDNAの量を精密に測定してインプットするDNAの量を調整してください。
- ✓ 固層可逆固定法(SPRI)による精製ステップに不具合がある可能性があります。精製に用いているAMPure XP ビーズの使用期限をご確認ください。ビーズの保存や操作の条件は、製造元推奨の内容に従ってください。使用前は必ず30分以上室温においてください。SPRIの操作では、新しく調製した70%エタノールを使用してください。

End Repair-A Tailing Buffer中に固形物が確認される

- ✓ 溶液を高速のボルテックスミキサにて混合し、固形物を溶解してください。始めに溶解したときに固形物があっても性能には影響しませんが、その後よく混合して固形物を溶解してからお使いください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より長い

- ✓ 断片化の条件が最適ではない可能性があります。分解していない高品質の DNA については、必ずプロトコルに記載されているとおり、遠心・ボルテックスミキサ含めて 2 段階で断片化を実施してください。
- ✓ microTUBE フィラメント中に泡が入っていると断片化が不完全になることがあります。最初の断片化工程の前に必ず microTUBE を 30 秒遠心して、泡が入っていないことを確認してください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より異なる

- ✓ FFPE DNA のキャプチャ前のライブラリには、インプット DNA 中のターゲット断片長より短い DNA の影響により、短いサイズのものが含まれることがあります。
- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、p. 45 のライブラリ調製時とキャプチャ前の精製ステップで示されている容量を必ず分注してください。ライブラリ調製のランセットとキャプチャ前精製プロトコルを同じ日に行わない場合は、AMPure XP ビーズはしっかりシールをし、4℃で保存してください。

得られたキャプチャ前ライブラリのQCで低分子量のアダプターダイマーピークが検出される

- ✓ 想定されるピーク以外に、低分子量のピークがあることは、ライブラリ中にアダプターダイマーが存在している可能性を示唆しています。p. 66 - p. 69 の図と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、次のターゲットエンリッチのステップに進んでも問題ありません。それ以上にアダプターダイマーが含まれている場合は、キャプチャ前のライブラリの収量を低下させる可能性があります。
- ✓ 全ゲノムシーケンス(本プロトコルを含めサポート外)のためには、アダプターダイマーピークが存在するサンプルは、追加で SPRI 精製の実施を推奨します。その際は、サンプルを Nuclease-free water で 50 µL に希釈して、AMPureXP_XT_LI_ILM_v.B1.0.1.pro:Pre-Capture PCR を実行してください。

キャプチャ後ライブラリの収量が低い

- ✓ PCR のサイクル数の最適化が必要な場合があります。キャプチャ後 PCR サイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製とターゲットエンリッチを再度実施してください。
- ✓ ハイブリダイゼーションに使用した RNA キャプチャライブラリに要因がある可能性があります。使用しているキャプチャライブラリのチューブや Certificate of Analysis に記載されている使用期限を確認してください。保存および取り扱いについては、推奨される内容に従ってください。p. 78 に示すように Capture Library Hybridization Mix はマスターミクスソースプレートに分注するまで氷上においてください。また、キャプチャライブラリを含む溶液は長時間室温に置かないでください。

得られたキャプチャ後ライブラリの断片長が想定より異なる

- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、p. 102 のキャプチャ後の精製ステップで推奨されている容量を必ず分注してください。

シーケンスの結果でon-target%が低い

- ✓ ハイブリダイゼーションでは、ハイブリダイゼーション反応液を室温に晒す時間を最小にしてください。混合して戻すステップ（p. 87 の step 29）でサンプルの温度を 65°C に保てるように、ボルテックスとチューブやプレートのスピンドアウンのための遠心装置は、極力サーマルサイクラの近くにおいてください。

シーケンスの結果でAT-ドロップアウトが高くuniformity of coverage が低い

- ✓ AT-ドロップアウトが高いことは、ハイブリダイゼーションの条件が厳し過ぎて、AT-rich なターゲットを求められるカバレッジレベルが得られなかったことが考えられます。ハイブリダイゼーションでのサーマルサイクラプログラムについて、Segment 4 と 5 のハイブリ温度を 65°C から 62.5°C もしくは 60°C に下げて（p. 76、表 39 参照）、再度低い stringency の条件でハイブリダイゼーションを行います。

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

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

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、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製、転載、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複製、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

*** SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。**

*** 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。**

