

**アジレント SureSelect
ターゲットエンリッチメントシステム
Ion Proton シーケンス**

和文プロトコル

Protocol

Protocol Version A4 対応

[2014年8月27日版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した SureSelect プラットフォーム
Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

1. はじめに

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、最新の英語版を参照くださるようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の
Protocol
SureSelect Target Enrichment System
for Sequencing on Ion Proton
Version A4, July 2014
G7530-90005

に対応していますが、一部日本の冬季の室温にあわせて改訂しています。本バージョンについての英文、和文の記載の違いについては、和文プロトコルを参照ください。

このプロトコルでは、Ion Proton システムシーケンスに対応したアジレント SureSelect Target Enrichment System のサンプル調製キットを用い、ゲノムの中のターゲット領域を Capture するための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ビオチン化 RNA オリゴマーライブラリ (Bait) を使い、リピート配列や自身の研究の対象外となるシーケンスを排除して、ターゲットとするゲノム DNA の領域を濃縮するために開発、最適化されています。サンプルはプールするサンプルにインデックスを付けてから個別にキャプチャを行い、キャプチャ後にプールするポストプール対応のプロトコルです。

このプロトコルは、ライフテクノロジーズ社 Ion Proton シーケンス対応用の SureSelect キットと Ion Xpress Plus fragment library キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。プレプール法、マルチプレックスではないライブラリ、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. サンプル調製

この章では、ターゲット領域の濃縮に用いるDNAサンプルの調製法について説明しています。

3. ハイブリダイゼーション

この章では、サンプルの調製とハイブリダイゼーションのステップについて説明しています。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

この章では、ハイブリダイゼーション後のサンプルの増幅、精製と品質チェックのステップについて説明しています。

5. リファレンス

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

1. はじめに

これまでのバージョンでの変更点

Ver A2 での変更点

- ・p.43 サンプルのプール溶液の DNA 濃度の推奨を 5 nM から 10 nM に変更しました。

VerA1 2013 年 11 月 28 日版 和文 での変更点

- ・[2013 年 11 月版 和文]では STEP 6. アダプター付加 DNA ライブラリの増幅の表 6 に誤りがあったため訂正しました。

目次

1. はじめに 6

- 操作に関する注意 7
- 安全に関する注意 7
- 実験に必要な試薬 8
- 実験に必要な装置、消耗品類 10

2. サンプルの調製 12

- STEP 1. Ion Shear Plus Reagents を用いた DNA の断片化 15
- STEP 2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製とサイズ選抜 16
- STEP 3. 断片化 DNA の電気泳動による品質(サイズ)チェック 18
- STEP 4. アダプターライゲーション 19
- STEP 5. アダプター付加 DNA ライブラリの Agencourt AMPure XP ビーズによる精製 21
- STEP 6. アダプター付加 DNA ライブラリの増幅 22
- STEP 7. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 24
- STEP 8. 増幅ライブラリの Agilent2100 バイオアナライザによるサイズチェックと定量 25

3. ハイブリダイゼーション 27

- STEP 1. ライブラリのハイブリダイゼーション 29
- STEP 2. 磁気ビーズの調製 35
- STEP 3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 36

4. ハイブリダイゼーション後の増幅 38

- STEP 1. キャプチャライブラリの増幅 39
- STEP 2. 増幅サンプルの Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 41
- STEP 3. 品質評価 42
- STEP 4. 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 44
- STEP 5. E-Gel によるサイズ選択 45
- STEP 6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 47
- STEP 7. 品質評価 48
- STEP 8. シーケンスのテンプレートを準備する 50

5. リファレンス 51

- 試薬一覧 52
- その他のキットに含まれる試薬 54
- キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて 55

1. はじめに

1. はじめに

最新のプロトコルを参照してください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

Target Enrichment Kit を本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となります点、ご了承ください。SureSelect キャプチャライブラリとその試薬は納品後 1 年以内にご使用頂きますようお願いいたします。

NOTE

本プロトコルは、ライフテクノロジーズ社のイオンエクスプレスプラスフラグメント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

本プロトコルは、アジレント社の SureSelect キットを用いて、ライフテクノロジー用のイオンエクスプレスプラスフラグメントライブラリを作製します。各増幅ステップで使用する Primer と、ハイブリダイゼーションで用いる Blocking Agent の種類を間違えないようご注意ください。

NOTE

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

NOTE

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

操作に関する注意

- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- ・ 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- ・ gDNA を含む溶液は、Vortex で混合しないようにしてください。指でそっとタッピングすることで、液を混合するようにしてください。
- ・ gDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けるようにしてください。
- ・ 凍結しているストック溶液を使用する際には次のステップで行います。
 1. 室温以上の温度で加熱しないように、かつできるだけ速く分注された溶液を融かします。
 2. Vortex Mixer で軽く短時間混ぜ、遠心機で5～10秒遠心して、チューブの壁やふたについた液を落とします。
 3. 使用時までオンアイスまたは冷却ブロックの中で保存します。
- ・ Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

安全に関する注意

CAUTION

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

1. はじめに

実験に必要な試薬

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

<http://agilentgenomics.jp>

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 1 実験に必要な試薬

＜必要な試薬類＞						
品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	必要量/1反応あたり	内容量	備考
SureSelect 試薬キット						
SureSelect TE Reagent Kit, PTN, 16 reactions	Agilent	G9605A	—	1	16反応分	マルチプレックス対応
SureSelect TE Reagent Kit, PTN, 96 reactions	Agilent	G9605B	—	1	96反応分	マルチプレックス対応
SureSelect XT キャプチャライブラリ(バイト)キット						
SureSelect XT Clinical Research Exome, 16 reactions	Agilent	5190-7338	—	1	16反応分	
SureSelect XT Clinical Research Exome, 96 reactions	Agilent	5190-7339	—	1	96反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5, 16 reactions	Agilent	5190-6208	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5, 96 reactions	Agilent	5190-6209	—	1	96反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs, 16 reactions	Agilent	5190-6213	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs, 96 reactions	Agilent	5190-6214	—	1	96反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+incRNA, 16 reactions	Agilent	5190-6446	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+incRNA, 96 reactions	Agilent	5190-6447	—	1	96反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5 Plus, 16 reactions	Agilent	5190-6211	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5 Plus, 96 reactions	Agilent	5190-6212	—	1	96反応分	
SureSelect XT Mouse All Exon, 16 reactions	Agilent	5190-4641	—	1	16反応分	
SureSelect XT Mouse All Exon, 96 reactions	Agilent	5190-4642	—	1	96反応分	
SureSelect XT Custom 1 kb から 499 kb, 16 reactions	Agilent	5190-4806	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4811
SureSelect XT Custom 1 kb から 499 kb, 96 reactions	Agilent	5190-4807	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4812
SureSelect XT Custom 0.5 Mb から 2.9 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4816	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4821
SureSelect XT Custom 0.5 Mb から 2.9 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4817	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4822
SureSelect XT Custom 3 Mb から 5.9 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4826	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4831
SureSelect XT Custom 3 Mb から 5.9 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4827	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4832
SureSelect XT Custom 6 Mb から 11.9 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4836	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4841
SureSelect XT Custom 6 Mb から 11.9 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4837	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4842
SureSelect XT Custom 12 Mb から 24 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4896	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4901
SureSelect XT Custom 12 Mb から 24 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4897	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4902

その他の試薬						
品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当	必要量/1反応あたり	内容量	備考
Ion Xpress Plus Fragment Library Kit	Life Technologies	4471269	指定	1	最大 10反応	1 ugスタート
Ion Xpress Barcode Adapter Kit 1-16 Kit	Life Technologies	4471250	指定	1	1バーコード 2サンプル	1 ugスタート
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Agilent	600677	指定	2 uL	200 uL	dNTP溶液付きのタイプが必要です。大容量タイプ(600679, 400 uL)もあります。
※お持ちの電気泳動装置に応じ、バイオアナライザもしくはTapeStation用、いずれかの消耗品をご用意下さい。						
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	3ラン	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1ラン	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。エクスパートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です
Agilent 2200 TapeStation消耗品						
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	1ラン		
Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape キット	Agilent	5067-5365	推奨	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Agilent TapeStation Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	推奨	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	495 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
E-Gel SizeSelect 2% Agarose Gel	Life Technologies	G6610-02	指定	1ラン	10	
50 bp ladder	Life Technologies	10416-014	指定	250 ng	50 ug	
1x Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当		100 mL	ビーズ精製、サンプルプールとE-Gelのステップで使用
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約348 uL	500 mL	DEPC処理ではないこと
100% Ethanol, molecular biology grade	Sigma Aldrich	E7023	相当			96%以上で、分子生物学用グレード 他の有機溶剤のコンタミネーションがないこと
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade					3.8 mL	

Ion PI Template OT2 200 Kit v2	Life Technologies	4485146	指定		Life Technologies社の最新マニュアル参照
Ion PI Sequencing 200 Kit v2	Life Technologies	4485149	指定		Life Technologies社の最新マニュアル参照
Qubit dsDNA HS Assay Kit または	Life Technologies	Q32851	推奨	100 assay	スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために 用います。
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	推奨	100 assay	BR Assay Kit の500 assay (Q32853)、1000 assay (Q33130) もあります。

※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のカスタムデザインを SureDesign で行った場合は、デザイン ID が、SureDesign 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。

1. はじめに

実験に必要な装置、消耗品類

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

<http://agilentgenomics.jp>

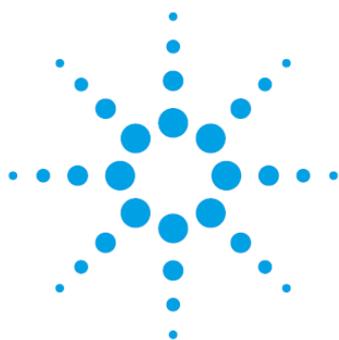
サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 2 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量	備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。					
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定		キャプチャ前後のDNAライブラリの定量とサイズ確認に必要です。Expert Control Software B.02.07以降のversionであること。
Agilent 2200 TapeStation	Agilent	G2964AA またはG2965AA	指定		キャプチャ前後のDNAライブラリの定量とサイズ確認に必要です。
Ion One Touch 2 System	Life Technologies	4474779	指定		
Qubit®2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨		スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当		65°C 24h のハイブリで、27uLの液が24uL 以下まで蒸発しないこと (HotTop使用時)
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		
旋回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV-03	相当		磁気ビーズ溶液がチューブを上下してよく混ざるように、旋回運動をするタイプのもの。 別売りの専用チューブラック (WEB-03-12) と組み合わせると便利。
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当		45°C以下の低温で、25uLのDNA溶液 (水) が1~2時間程度で濃縮できること。 専用ロータ、冷却トラップTU-500と油回転真空ポンプGLD-051が必要。
Dynal DynaMag-2	Life Technologies (ベリタス)	123-21D	相当		1.5 - 2mL 遠心チューブ 16本立ての磁気ビーズ用磁石スタンド
E-Gel iBase and E-Gel Safe Imager Combo Kit	Life Technologies	G6465	指定		下記のG6500とG6400がセットになった製品です。
または Safe Imager Real-Time Transilluminator と E-Gel iBase Power System	Life Technologies	G6500 G6400	指定		上記のコンボか、こちらの組み合わせのどちらかが必要です。
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plates または optical strip tubes	Agilent	410088 または 401428	相当	Plate 2枚 Strip Tube 4連	Strip Tubes 120本 PCR Plate 25プレート
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	相当	キャップ 4連	strip caps 120本
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	4306311	相当	4枚	100 films
Tube-strip capping tool			相当		PCRチューブのキャップを確実に密閉するために便利なツールです。
Nuclease Free 1.5 mL microfuge tubes	Life Technologies	AM12400	相当	約28本	500本
Nuclease Free 0.2mL PCRチューブ (thin-walled)	Eppendorf	95262- 0030 124.332	相当	約8本	1000本
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856			
ピペット	Pipetman	P10,P20,P 200,P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体に対して同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアロゾルブロックフィルター付き 滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当		
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly-Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当		
アイスバケツ タイマー					
ボルテックスミキサー 卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII	相当		
ヒートブロック (37°C)、1.5mLのチューブが入るタイプ					AM Pure XPビーズによる精製ステップで使用します。
ウォータバス (Wash 2のPreWarm 65°C)			相当		

※65°C、16 時間もしくは 24 時間のハイブリダイゼーションに用いる PCR 装置、チューブまたは 96well-plate とキャップは、必ず事前にハイブリダイゼーション液が 4 μ L 以上、蒸発しないことを確認してから使用してください。

2. サンプルの調製



この章では、ライフテクノロジーズ社の Ion Proton 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 システムを用いて調製する方法を説明します。マルチプレックスシーケンスを行う各サンプルについて、個別にライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、およびキャプチャのステップを行います。断片化 DNA にアダプターをライゲーションするときに、あわせてインデックス(バーコード)シーケンスを各サンプルに付加します。ライフテクノロジーズ社が販売する Ion Proton 用のインデックスタグを使って、1 チップあたり最大 16 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスを行うことができます。マルチプレックスシーケンスの詳細はライフテクノロジーズ社のプロトコルを参照してください。

ライフテクノロジーズ社のオリジナルプロトコルとは、増幅に Herculase II 酵素を使う点、また E-Gel のサイズ選択を行うステップなどが異なりますのでご注意ください。

他の情報に関しては、ライフテクノロジーズの *Ion Xpress Plus Fragment Library Kit* (p/n 4471269) のプロトコル、または適切なライフテクノロジーズのプロトコルを参照してください。

NOTE

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

操作の概略

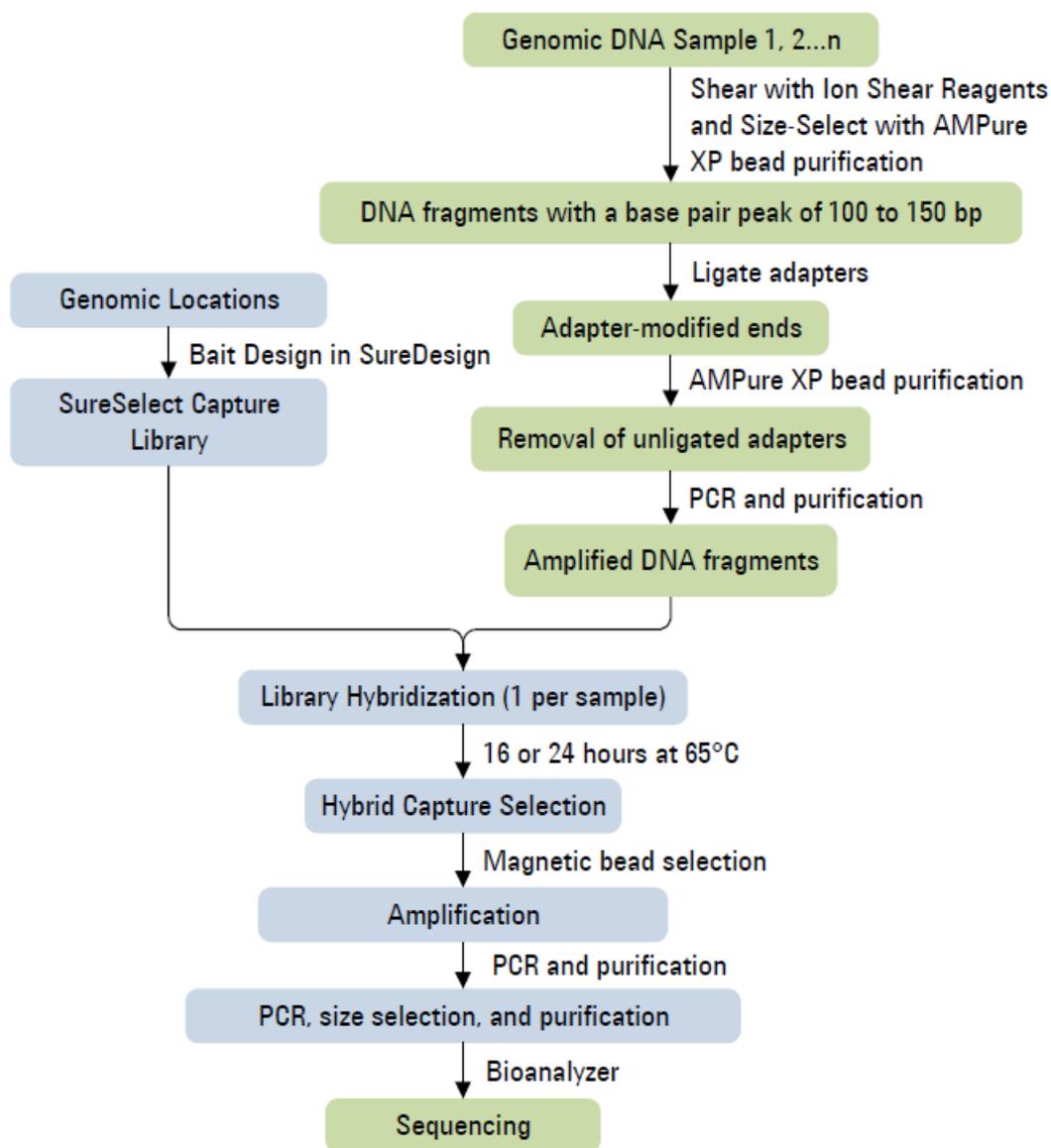


図 1 サンプル調製ワークフロー

2. サンプルの調製

表 3 実験の概略と所要時間

Step	Time
Ion Xpress Plus Prepped library Production	1 day
Library Hybridization	17 to 25 hours
Bead preparation	30 minutes
Capture Selection and Washing	2 hours
Post-Hybridization Amplification	1 hour
PCR purification	30 minutes
E-gel size selection	30 minutes
Bioanalyzer QC	1 hour

STEP 1. Ion Shear Plus Reagents を用いた DNA の断片化

マルチプレックスシーケンスを行う DNA のサンプルごとに、1 ライブラリを調製します。

Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies p/n 4471269)の試薬を使用してください。

1. Qubit dsDNA Assay キットを用いて、gDNA の濃度を測定します。実験には高品質の gDNA を用いるようにします(分解しておらず、A260/A280 の比が 1.8-2.0 の間であること)。
2. gDNA 1ug を nuclease-free 水で、100 ng/uL (容量 10 uL)になるように希釈します。

CAUTION gDNA 希釈液中の EDTA 終濃度は 0.1 mM 未満になるように調整して下さい。

3. 各サンプルを表 4 の試薬と混合します。

表 4 Ion Shear 試薬

Component	Volume
nuclease-free water	25 μ L
diluted gDNA	10 μ L
Ion Shear Plus 10x Reaction Buffer	5 μ L
Total	40 μL

4. Ion Shear Plus Enzyme Mix を 10 uL 加え、ピペティングでよく混合します。

CAUTION 気泡を導入しないように注意して下さい。

5. ヒートブロックあるいはウォーターバスを使って、37°Cで 50 分間インキュベートします。各実験室での環境で約 130 bp のピークを得られるように、インキュベーション時間を 50 分から 60 分の間で調節してください。この待ち時間の間に、次のステップで使用する AMPure ビーズを室温に戻し、必要な 70%エタノールを調製します。一日に使用する量の AMPure ビーズと 70%エタノールをここでまとめて準備することも出来ます。
6. インキュベーション終了後、すみやかに Ion Shear Plus Stop Buffer を 5 uL 加え、ボルテックスで 5 秒間しっかりと混合します。
7. 反応チューブを氷上に置きます。

STEP 2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製とサイズ選抜

CAUTION

本ステップの AMPureXP 精製は AMPureXP ビーズによるサイズ選抜を行うため、他の精製ステップと異なるステップがあります。下記の操作手順に十分注意して実施してください。

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。ヒートブロックを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
3. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60.5 uL を、1.5mL の LoBind チューブに入れます。前項で調製した断片化済みの DNA サンプル 約 55 uL を同じチューブに加えます。ボルテックスミキサでよく攪拌し、5 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 3~5 分間かかります)。
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま透明な上澄み液約 110 uL を取り分け、新しい 1.5 mL LoBind Tube に移します。**この上澄み液に必要な長さのサンプル DNA が含まれているので、液を捨てないように注意してください。**ビーズはこの時点で廃棄します。
6. 前ステップで回収した上澄み液に、均一な AMPure XP ビーズ溶液を 38.5 uL 加えます。ボルテックスミキサでよく攪拌し、5 分間インキュベートします。
7. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 3~5 分間かかります)。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズに触れないように注意しながら、上澄み液を取り除いて廃棄します。
9. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、それぞれのチューブに 70% エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70% エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
10. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後、ビーズを吸い込まないように注意しながらエタノールを取り除きます。
11. 9 と 10 のステップをもう一度繰り返します。
12. チューブを磁石スタンドから外し、軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
13. サンプルチューブを 37°C のヒートブロックにセットして、5 分間、37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
14. 27 uL の Nuclease-free 水を加え、ボルテックスミキサでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精

製された DNA は溶液のほうに移っています。

16. 上澄み液 27 μ L を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

2. サンプルの調製

STEP 3. 断片化 DNA の電気泳動による品質(サイズ)チェック

NOTE

バイオアナライザの代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 試薬キット (Agilent p/n 5067-5583) を使用方法も選択できます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して下さい。

【バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使う場合】

バイオアナライザの和文ガイドブックは下記ウェブサイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

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

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。断片化した DNA サンプルを 1 uL、バイオアナライザのラボチップにアプライしてください
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックし、サンプル名・コメントを記入します。
7. 結果をチェックします。下記の泳動図のような分布が得られ、50 - 250 bp 付近の位置にピークがあることを確認します。濃度が 15 ng/uL より高い場合水で 15 ng/uL になるように希釈し、次のステップであるアダプター付加には、そこから 25 uL のサイズ選択されたライブラリを使用します。

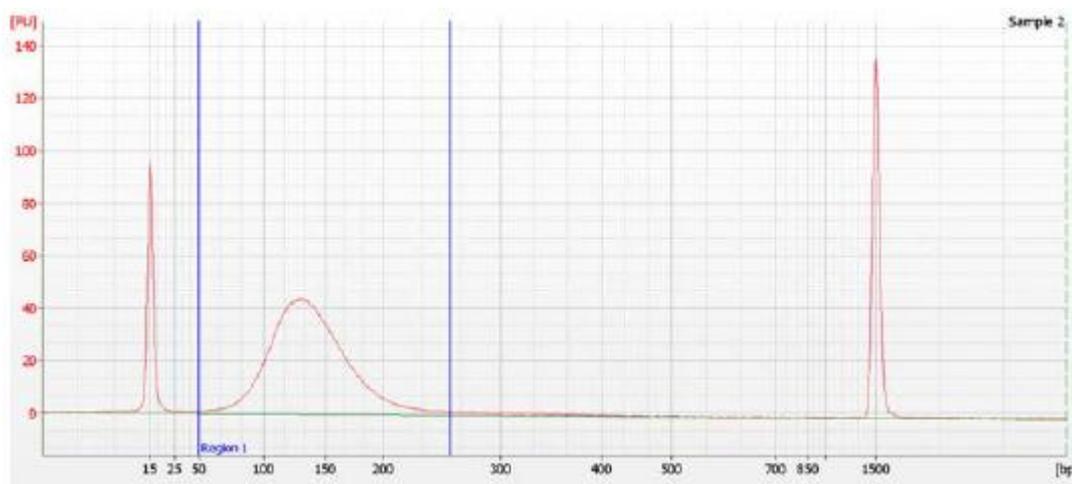


図 2 断片化したgDNAのバイオアナライザ DNA1000アッセイによる泳動図。50 - 250 bp付近の位置にピークの分布が見られます。

STEP 4. アダプターライゲーション

Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies p/n 4471269)と Ion Xpress Barcode Adapters Kit を使用します。

1. 表 5 に従って、サンプル数に応じた反応液マスターミックスを氷上で作製します。表の 12 反応分の量は 1 ライブラリ分の約 1.04 倍の量で計算されています
2. ピペッティングにより溶液を静かに混合します。

表 5 ライゲーションマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction (μL)	Volume for 12 reactions (includes excess) (μL)
Nuclease-free Water	31	387.5
10x Ligase Buffer	10	125
Ion Xpress P1 Adapter *	10	125
Nick Repair Polymerase	8	100
DNA Ligase	4	50
dNTP Mix	2	25
Total Volume	65	812.50

*Ion Xpress Barcode Adapters Kit に含まれます

2. サンプルの調製

3. サンプル数と同じ数の新しいチューブに、調製したライゲーションマスターミックスを、65 uL ずつ分注していきます。
4. 10 uL の Ion Xpress Barcode 1 から 16 のうち使用する 1 種類ずつを、ライゲーションマスターミックス 65 uL の入った各チューブに加えます。この時点でそれぞれのチューブは、65 uL のライゲーションマスターミックスと、1 種類のバーコードアダプタ 10 uL の計 75 uL 溶液が入った状態となります。
5. 各チューブに、DNA サンプルを 25 uL 加えます。計 100 uL となります。
6. サーマルサイクラを使用し、以下のプログラムでサンプルをインキュベートします。サーマルサイクラの Hot Top はオフにします。この待ち時間の間に、次のステップで使用する AMPure ビーズを室温に戻し、必要な 70%エタノールを準備します。
 - ・25°C、15 分
 - ・72°C、5 分
 - ・4°C、(hold)
7. 速やかに次のステップに進んでください。

STEP 5. アダプター付加 DNA ライブラリの Agencourt AMPure XP ビーズによる精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。ヒートブロックを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
3. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、1.5 mL の LoBind チューブに入れます。前項で調製したアダプター付加 DNA ライブラリ 約 100 uL を同じチューブに加えます。ボルテックスミキサーでよく攪拌し、5 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 3~5 分間かかります)。
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70 %エタノール溶液を各チューブに 500 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70 %エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
9. チューブを磁石スタンドから外し、軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
10. サンプルチューブを 37 °C のヒートブロックにセットして、5 分間、37 °C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
11. 50 uL の Nuclease-free 水を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。
12. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
13. 上澄み液 約 50 uL を新しい 1.5 mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移っているため、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

2. サンプルの調製

STEP 6. アダプター付加 DNA ライブラリの増幅

以下のキットを使用します。

- SureSelect Target Enrichment Kit PTN Hyb Module Box #2
- Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent)

このプロトコルでは、前項で調製した両端にアダプターライゲーションされた DNA 断片の半分の量を使用します。残りの半量は、-20°Cで保管してください。

CAUTION

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

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

- 表 6 に従って、サンプル数に応じた反応液を作製します。表の 12 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.04 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。
- 25 uL の反応液を新しいプレートのそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
- 各 DNA サンプル 25 uL を、反応液の入ったそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。ピペティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

NOTE

PCR に用いるアダプター付加 DNA ライブラリの適量は 200 ng 以下です。

表 6 PCR ミックスを構成する試薬

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 12 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	11 µL	137.5 µL
5× Herculase II Rxn Buffer (clear cap)*	10 µL	125 µL
SureSelect PTN PCR primer mix (clear cap)†	2.5 µL	31.2 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)*	1 µL	12.5 µL
100 mM dNTP Mix (green cap)*	0.5 µL	6.3 µL
Total	25 µL	312.5 µL (25 µL/reaction)

* Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent) に含まれます。他のキットの Buffer と dNTP mix は使用しないようにしてください。

† SureSelect Target Enrichment Kit PTN Box #2 に含まれます。

2. 表 7 に従ってサーマルサイクラを設定し、サンプルの反応を開始してください。この待ち時間の間に、次のステップで使用する AMPure ビーズを室温に戻し、必要な 70%エタノールを準備します。

表 7

Step	Temperature	Time
Step 1	98°C	2 minutes
Step 2	98°C	30 seconds
Step 3	60°C	10 seconds
Step 4	72°C	1 minute
Step 5		Repeat Step 2 through Step 4 for a total of 7 to 9 times.
Step 6	72°C	10 minutes
Step 7	4°C	Hold

NOTE

用いる DNA の品質の違いにより、ライブラリ調製の結果は、サンプルごとに少し異なります。ほとんどのケースでは、8 サイクルの増幅により、バイアスを抑え、かつ非特異的な増幅がない状態で、キャプチャに足る収量を得ることができます。より大きな分子量の非特異的な増幅が見られる場合は、増幅に用いなかった残りの半量のライブラリのテンプレート希釈する、もしくはサイクル数を減らすなどにより、高分子産物が生成しないように再度増幅してください。少量の 400 bp 付近の高分子 PCR 産物であれば、キャプチャ性能には影響しません。

PCR サイクルの別の確認方法として、以下の方法でテストランを行うことができます。PCR mix 溶液を各 10 uL の溶液量になるように 3 本に分けて、7,8,9 サイクルをそれぞれ試します。この 10uL の反応液量のサンプルを AMPure XP ビーズで精製するにあたっては、STEP5 を参照し、用いる AMPure XP ビーズ溶液を 30 uL に、溶出する Nuclease-free 水の量を 20 uL に変更して下さい。続いて STEP8 でバイオアナライザを用いて、サイズと濃度の確認をします。

最適なサイクル数を決定した後に、残りのサンプルのうち 25 uL を用いて、50uL の反応液量で再度 PCR を行ってください。

2. サンプルの調製

STEP 7. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 少なくとも使用する 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。ヒートブロックを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
3. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、1.5mL の LoBind チューブに入れます。前項で増幅させた DNA サンプル 約 50 uL を同じチューブに加えます。ボルテックスミキサーでよく攪拌し、5 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 3~5 分間かかります)。
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70 %エタノール溶液を各チューブに 500 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70 %エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
9. チューブを磁石スタンドから外し、軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
10. サンプルチューブを 37 °C のヒートブロックにセットして、37 °C で 5 分間乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
11. 25 uL の Nuclease-free 水を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。その後、室温で 2 分間インキュベーションします。
12. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
13. 上澄み液 約 25 uL を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

STEP 8. 増幅ライブラリの Agilent2100 バイオアナライザによるサイズチェックと定量

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

NOTE

バイオアナライザの代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 試薬キット (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法も選択できます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して下さい。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア (version B.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 増幅させた DNA サンプルを 1 uL 添加します。
5. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
6. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
7. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
8. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 220 bp の位置にスミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。

3. ハイブリダイゼーション

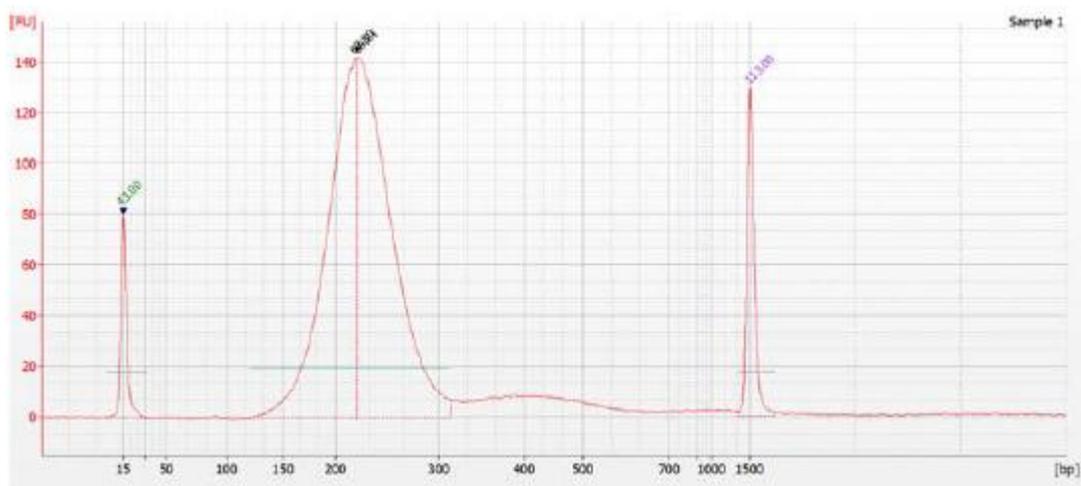


図 3 増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。220 bp の位置に、シングルヌメアピークのピークトップが観察される。400 bp 付近の高分子 PCR 産物は、キャプチャ性能には影響しません。

Stopping Point

次のステップに進まない場合、このサンプルは 4°Cで一晩、それ以上の長期であれば -20 °Cで保管することができます。

3. ハイブリダイゼーション



この章では、前章で調製したライフテクノロジーズ社のアダプター付加 DNA ライブラリと、アジレント社の SureSelect 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試薬とブロッキング試薬とともにハイブリダイズします。

CAUTION

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

CAUTION

キャプチャのためのハイブリダイゼーションは 16 時間もしくは 24 時間(以上)行いますが、この間に 27-29 uL という少量のハイブリダイゼーション溶液の蒸発を防ぐ必要があります。

実験を行う前に、必ず、実験で使用する予定のサーマルサイクラ装置 (Hot lid 付き)、Strip チューブもしくはプレート、シール方法 (Strip キャップもしくはシーリングテープ) の組み合わせで、オリゴキャプチャライブラリとアダプター付き DNA ライブラリを入れない状態で、水 27uL をハイブリ溶液の代わりに用意し、65°C で 24 時間(以上)の条件で事前テストを行ってください。必ず使用する予定のウェルポジションに、テストサンプルをセットして試験するようにしてください(ウェルによっては、端と中央で、蒸発が異なるものがあります)。

キャップもしくはシールによる密閉を確実に行うことが重要です。

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

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

3. ハイブリダイゼーション

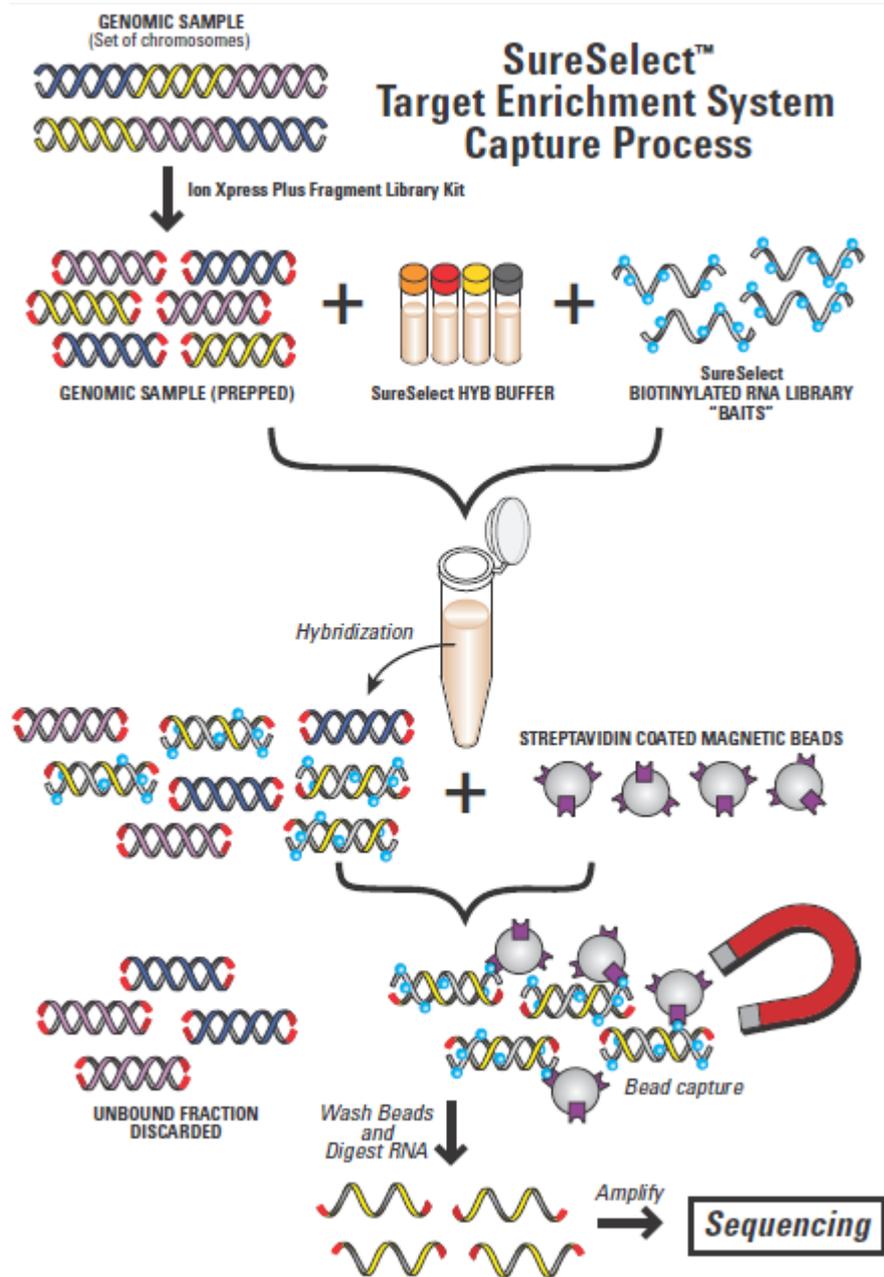


図 4 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのキャプチャプロセス 概略

STEP 1. ライブラリのハイブリダイゼーション

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

各ハイブリダイゼーション反応は、750 ng の調製したアダプター付き DNA ライブラリを含むようにします。500 ng の DNA ライブラリでも実験は可能ですが、ライブラリの Complexity が下がり、Duplication rate が上がる傾向があります。

1. 調製したアダプター付き DNA ライブラリの濃度は、221 ng/uL 以上の濃度である必要があります。得られた濃度が低い場合には、以下の手順で 221 ng/uL 以上になるように濃縮遠心機を用いて濃縮してください。
 - a. サンプル全量を 1.5mL のチューブに入れます。チューブのふたには、1つ以上の穴をあけるようにしてください。またはチューブのふたを取り去り、パラフィルムでかわりにふたをして、そのパラフィルムに穴をあけておきます。
 - b. 45 °C 以下の低温で濃縮遠心機を用い、溶液を完全に蒸発させます。
 - c. 濃度が 221 ng/uL 以上になるように、適切な量の nuclease-free 水に再溶解させます。サンプルが濃縮遠心中に失われることが懸念される場合は、濃度が 147 ng/uL より濃くなるように、再溶解させます。ピペッティングによってチューブの内壁に付着したサンプルをよく再溶解させてください。
 - d. ボルテックスミキサーを用いて混合し、遠心機で1分間スピンドウンします。

もしくは、750 ng に相当する量のライブラリ溶液を別のチューブに取り分け、3.4uL になるまで濃縮をすることも可能です。ライブラリ溶液を完全乾固させた場合は 3.4uL の水に再溶解し、ボルテックスミキサーを用いて混合して下さい。多検体を一度に処理する場合、濃度調製する前に量が等しくなるように調節してください。

2. (オプション) 濃縮遠心後の最終濃度を確認したい場合は、前章の“STEP 8. Agilent2100 バイオアナライザによる DNA サンプルのサイズチェックと定量”を参照し、バイオアナライザを用いて測定します。バイオアナライザで最終確認した濃度に基づき、500ng から 750 ng のアダプター付き DNA ライブラリが、3.4uL の nuclease-free 水に溶解した濃度 (147 - 221 ng/uL) になるように、溶液を調製します。SureSelect オリゴキャプチャライブラリ (Bait) の量とのバランスから、アダプター付き DNA ライブラリ 500ng から 750 ng の量をハイブリダイゼーションに用いることは重要なポイントです。

3. ハイブリダイゼーション

3. 表 8 に従って、新しいチューブにハイブリダイゼーションバッファミックスを室温で調製します。

表 8 ハイブリダイゼーションバッファミックス

Reagent	Volume for 1 capture (µL), includes excess	Volume for 6 captures (µL), includes excess	Volume for 12 captures (µL), includes excess
SureSelect Hyb #1 (orange cap, or bottle)	25	125	250
SureSelect Hyb #2 (red cap)	1	5	10
SureSelect Hyb #3 (yellow cap)	10	50	100
SureSelect Hyb #4 (black cap, or bottle)	13	65	130
Total	49 (40 µL needed)	245 (40 µL/sample)	490 (40 µL/sample)

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

4. ハイブリダイゼーションバッファミックスを 65°C で 5 分間温めてください。その後、20°C 未満に冷えないように注意して保管します。ハイブリダイゼーションミックスは 20°C 未満の温度では析出し、結果に著しい悪影響を与える危険性があります。65°C で 5 分間加熱した後は、25°C に設定したヒートブロック中にハイブリダイゼーションミックスを置くことを推奨します。65°C で 5 分以上置くと、バッファは蒸発してしまうので、65°C での加熱は 5 分間としてください。
5. PCR プレートか Strip チューブ(もしくは 0.2 mL PCR チューブ)を用意し、ターゲット濃縮のための SureSelect オリゴキャプチャライブラリミックスを、下記手順で調製します。
 - a. PCR プレートまたはチューブは Step10 まで、氷上に置くようにします。
 - b. 新しい 1.5 mL のチューブに表 9 を参照して、RNase Block 溶液(紫キャップ)を RNase-free 水で希釈して、必要量の RNase Block 希釈液を調製します。
 - c. PCR プレートまたはチューブに、表 9 を参照して、デザインしたキャプチャライブラリのターゲットサイズ(Mb)に応じた量の SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(表中の SureSelect Library)を入れます。(使用前に、自分の使いたいキャプチャライブラリデザインの ID であることを確認してください。デザイン ID はチューブのラベル、またはチューブの入った箱のラベルに記載されています)
 - d. b で調製した RNase Block 希釈液を、表 9 を参照して、ターゲットサイズに応じた量を c で分注した各キャプチャライブラリに加えます。ピペティングで静かに混合します。乾燥を防ぐためにキャップをして、Step10 まで氷上に置いておきます。

表 9 SureSelect Capture Library

Capture Size	Volume of SureSelect Library	RNase Block Dilution (Parts RNase block: Parts water)	Volume of RNase Block Dilution to Add
< 3.0 Mb	2 µL	1:9 (10%)	5 µL
≥ 3.0 Mb	5 µL	1:3 (25%)	2 µL

6. 別のチューブを準備して、表 10 を参照して SureSelect Block Mix を必要量調製します。混合した後、ピペティングでよく混合します。

表 10 SureSelect Block Mix

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 12 reactions (includes excess)
SureSelect PTN Block #1 (green cap)	2.5 µL	31.25 µL
SureSelect Block #2 (blue cap)	2.5 µL	31.25 µL
SureSelect PTN Block #3 (brown cap)	0.6 µL	7.5 µL
Total	5.6 µL	70 µL

7. 別の PCR プレート (Strip チューブでも可) に、ターゲット濃縮のために調製したアダプター付き DNA ライブラリを調製します。
- 750 ng の量 (濃度 221 ng/µL) になるように調製したアダプター付き DNA ライブラリ 3.4 µL を、PCR プレートの“B”の列に入れます。複数のサンプルをキャプチャする場合は、それぞれのサンプルを異なるウェルに入れてください。
 - 5.6 µL の SureSelect Block Mix を“B”の列に入れます。
 - ピペティングでよく混合します。
 - PCR プレートの“B”の列 (もしくはバッファとサンプルを入れたウェル) をキャップできっちりと密閉し、PCR プレートをサーマルサイクラにセットします。ハイブリダイゼーションバッファとキャプチャライブラリはまだ加熱せずに、Block 溶液を加えたアダプター付き DNA ライブラリのみを以下のプログラムで加熱します。
 - 表 11 のプログラムに従い、サーマルサイクラをランします。

3. ハイブリダイゼーション

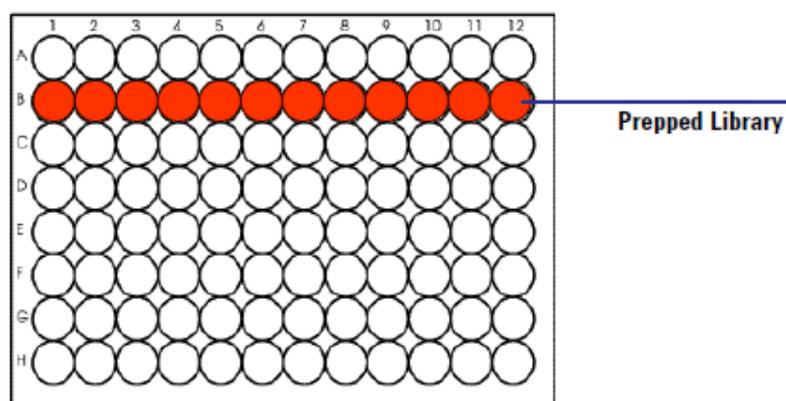


図 5 赤:DNA アダプター付きライブラリ (12 サンプルをキャプチャするためにセットした例)

表 11 PCR プログラム

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

8. 65 °Cでのhold中、heat lid(ふた)の温度を105 °C にセットするようにしてください。また、本インキュベーション後、次のステップに速やかに進むことが重要です。

CAUTION

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

9. ハイブリダイゼーションバッファを、以下の手順でサーマルサイクラ上の PCR プレートに加えます。
- PCR プレート を 65°C に保った状態で、3 で調製したハイブリダイゼーションバッファをそれぞれ 40 uL ずつ、キャプチャするサンプル数の分、PCR プレートの "A" のカラムに入れます。サンプルの数のウエルが、40 uL のハイブリダイゼーションバッファを加えられることとなります。下の図 6 は、12 サンプル分の例を示しています。

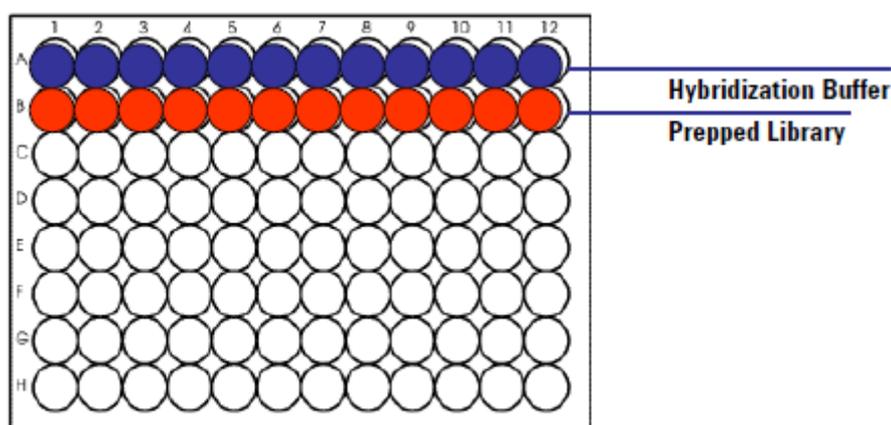


図 6 青:ハイブリダイゼーションバッファ (12 サンプルをキャプチャするためにセットした例)

- ウエルを Strip キャップで密閉します。適切なキャッピングツールなどを用いて、密閉が確実に

行われるようにしてください。

- c. ハイブリダイゼーションバッファを確実に 65°C に加温するため、PCR プレートは少なくともこのステップで 5 分以上、65°C に保つようにしてください。ただ、それ以上時間が経過すると溶液が蒸発していくので、5 分たったら次の Step10 にすみやかに進んでください。
10. Step 5 で調製したキャプチャライブラリミックスを下記手順で PCR プレートに入れます。
 - a. キャプチャライブラリミックス全量(7 uL)を、ハイブリバッファとアダプター付き DNA ライブラリを入れた PCR プレートの "C" 列に入れます。もし、複数のサンプルをキャプチャするために、PCR プレートを使用している場合は、マルチチャンネルピペットを使って、キャプチャライブラリミックスを "C" 列に移してください。この作業中 PCR プレートは 65 °C に保つようにしてください。
 - b. ウェルを Strip キャップで密閉します。適切なキャッピングツールなどを用いて、密閉が確実に行われるようにしてください。
 - c. 65 °C で 2 分間インキュベーションします。
 11. PCR プレートを 65 °C に保ったままの状態では、"A" 列のハイブリダイゼーションバッファ 13 uL を "C" 列の各オリゴキャプチャライブラリミックスに加えます。必要に応じてマルチピペットを使用してください。

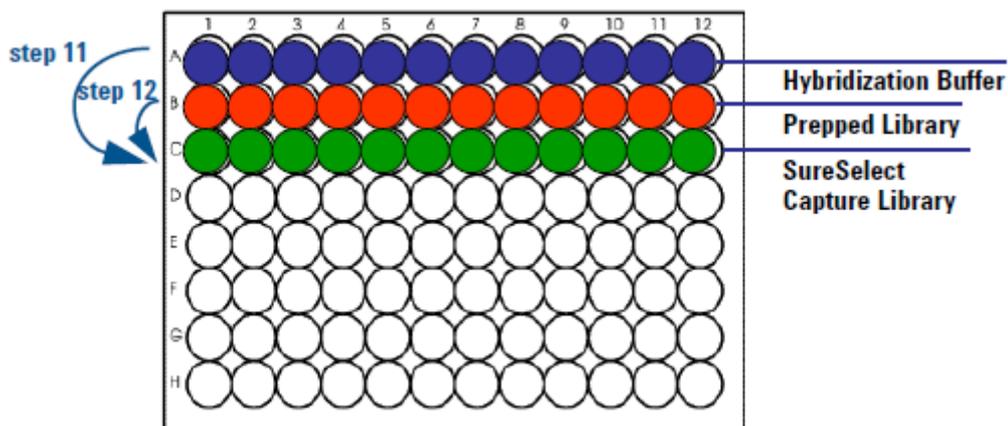


図 7 緑: SureSelect オリゴキャプチャライブラリ (Bait)
(12 サンプルをキャプチャするためにセットした例)

12. PCR プレートを 65 °C に保ったままの状態では、"B" 列のアダプター付き DNA ライブラリミックス 9 uL (9 uL より減っている場合、その全量)を "C" 列の各オリゴキャプチャライブラリミックスに加えます。必要に応じてマルチピペットを使用してください。ピペッティングを 8-10 回行って、"C" 列の液を十分に混合してください。ハイブリダイゼーション用の Mixture (アダプター付き DNA ライブラリ、ブロッキング試薬と SureSelect オリゴキャプチャライブラリのミックス)はこの時点で 27-29 uL の量とな

3. ハイブリダイゼーション

ります。量はこれまでの操作中の蒸発により異なります。

13. 事前のテストで蒸発が抑えられることを確認している Strip キャップか密閉用のフィルムを用いて、ウェルを確実に密閉します。フィルムで密封する場合は、2枚重ねてシールすることで密封度を上げることが推奨します。

CAUTION

サンプルが入ったすべてのウェルが確実に密閉されていることを確認してください。チューブやプレートとキャップの間にわずかでも隙間があると、液はハイブリ中に蒸発してしまいます。ハイブリダイゼーション中に3–4 uL以上の溶液が蒸発しないように、事前に使用するPCRプレートやチューブ、キャップの組み合わせでテストしてください。(p.27 参照)

14. ハイブリダイゼーション用の Mixture を 65°C (heat lid (ふた)は 105°C) で 16 時間または 24 時間 インキュベートします。

16 時間のハイブリダイゼーションを行う場合、必ず、オンビーズ PCR 法に対応した本プロトコルを参照して実験を行ってください。

実験の日程に応じて、週末を入れて 72 時間のハイブリダイゼーションを行うことは可能ですが、溶液が蒸発してしまう危険性が高くなります。必ず事前にテストして、4 uL 以上の蒸発がないことを確認した条件で実施してください。ハイブリダイゼーションは最低 16 時間以上必要です。

STEP 2. 磁気ビーズの調製

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Binding Buffer
- SureSelect Wash 2

1. 事前に SureSelect Wash 2 を水浴中で 65 °C に加温しておきます。1 サンプルあたり 1.5 mL 使用しますので、必要量をコニカルチューブに入れて、加温します。次の STEP3 で使用します。
2. ボルテックスミキサーを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies、ベリタス) 磁気ビーズを十分に再懸濁します。磁気ビーズは必ず指定のものを使用してください。
3. 1 サンプルあたり 1 本の 1.5mL の LoBind チューブに、50 uL の Dynal 磁気ビーズを加えます。
4. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 200 uL の SureSelect Binding Buffer を加えます。
 - b. ビーズをボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌します。
 - c. ビーズの入ったチューブを専用の磁石にセットします。Dynal DynaMag-2 などの磁気ビーズ専用の磁石をお使いください。チューブを磁石に取り付けるときに、チューブをわずかに左右に動かしながらセットすると、ビーズがよりシャープに集まります。
 - d. ビーズを吸い込まないように注意しながら、上澄み液を取り除いて廃棄します。
 - e. ステップ a から d までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。
5. ビーズを 200 uL の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。

3. ハイブリダイゼーション

STEP 3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Wash 1
 - SureSelect Wash 2
1. 16 時間もしくは 24 時間のハイブリダイゼーション後、チューブに残っているハイブリダイゼーション溶液(アダプター付き DNA と SureSelect オリゴキャプチャライブラリの混合液)の量を、ピペットを使って測定し、記録します。複数のサンプルを同時にキャプチャしている場合は、ひとつずつ作業を行い、他のサンプルチューブは 65°C の PCR 装置に載せたままで、ビーズ溶液と混ぜるまでキャップを開けて蒸発させたり、冷やしたりしないように注意してください。この計測はできるだけ短時間に行ってください。20 uL 以下に液が減っている場合、キャプチャ性能に悪影響を与える可能性があります。また完全に蒸発してしまっている場合は、実験をこれ以上進めることができません。再度、蒸発を最小に防ぐための組み合わせを確認してください。
 2. PCR プレートあるいはチューブを PCR 装置で 65°C に保ちながら、ピペットで吸引して計量したハイブリダイゼーション溶液を、そのまま直接ビーズ溶液に加えます。チューブを 3~5 回上下させて、液を混合します。続けて次のサンプルを処理する場合は、必ずピペットチップを新しいものに交換し、目盛を 29 uL に戻すようにしてください。
 3. ハイブリダイゼーション溶液とビーズの入ったチューブを巡回運動するミキサーの上にセットし、室温で 30 分間インキュベーションします。ビーズがチューブ中を動いて攪拌が行われていることを確認してください。
 4. インキュベーション後、軽くスピンドウンします。
 5. チューブを専用磁石にセットし、ビーズとバッファを分けます。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます(ビーズを吸い込むと、収量に影響します)。
 6. ビーズの入ったチューブに、500 uL の SureSelect Wash 1 を加え、ボルテックスミキサで 5 秒間攪拌して、ビーズを再懸濁させます。
 7. サンプルを室温で 15 分間インキュベーションします。時々ボルテックスミキサで攪拌してください。
 8. 軽くスピンドウンします。
 9. ビーズの入ったチューブを専用の磁石にセットして、ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除きます。
 10. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 事前に 65 °C に加温しておいた SureSelect Wash 2 を 500 uL チューブに加え、ボルテックスミキサで 5 秒間攪拌して、ビーズを再懸濁させます。
 - b. 65 °C で 10 分間インキュベーションします。時々ボルテックスミキサで攪拌してください。組織

培養用インキュベータは温度を適切に保てないため使用しないで下さい。

- c. インキュベーション中にビーズが均一になるように転倒混和した後、軽くスピンドウンします。
 - d. チューブを専用磁石にセットし、ビーズとバッファを分けます。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。
 - e. ステップ a から d までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。
 - f. 3 回の洗浄の後、ビーズの入ったチューブを専用の磁石にセットして、Wash 2 を完全に取り除きます。
11. 30 uL の nuclease-free 水をビーズに加えてボルテックスミキサで 5 秒間攪拌し、ビーズを再懸濁して下さい。

NOTE

キャプチャした DNA サンプルは、キャプチャ後の増幅の段階でストレプトアビジンビーズの上に保持されています

Stopping Point

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4°C で一晩、それ以上の長期であれば -20 °C で保管することができます。

3. ハイブリダイゼーション

4. ハイブリダイゼーション後の増幅



この章では、前章で調製したキャプチャ後のライブラリを、増幅する過程で同時に精製し、定量および品質確認を行うステップを説明します。

STEP 1. キャプチャライブラリの増幅

以下の試薬を使用してください。

- [Herculase II Fusion DNA Polymerase \(Agilent\)](#)
- [SureSelect Target Enrichment Kit PTN Hyb Module Box #2](#)

CAUTION

ここに指定されている Herculase II Fusion DNA Polymerase 以外の酵素を使用しないでください。他の DNA Polymerase については、バリデーションされていません。

CAUTION

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

1 つのキャプチャ済みライブラリに対して、1 本のチューブで増幅反応を行います。テンプレートを入れない Negative Control も準備してください。

- 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します（氷上で調製）。
 - 表 12**に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 12 反応分の量は 1 反応分の約 1.04 倍の量で計算されています。ピペティングにより、溶液を静かに混合します。
 - 36 μL の反応液をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
 - 各 DNA サンプルビーズ溶液 14 μL をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。ピペティングにより溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

表 12 Herculase II master mix

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 12 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	22.5 μL	281.25 μL
5 \times Herculase II Rxn Buffer (clear cap) *	10 μL	125 μL
SureSelect PTN PCR primer mix (clear cap) †	2 μL	25 μL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap) *	1 μL	12.5 μL
100 mM dNTP Mix (green cap) *	0.5 μL	6.25 μL
Total	36 μL	450 μL (36 μL/reaction)

* [Herculase II Fusion DNA Polymerase \(Agilent\)](#) キットに含まれます。他のキットの Buffer と dNTP mix は使用しないようにしてください。

† [SureSelect Target Enrichment Kit PTN Hyb Module Box #2](#) に含まれます。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

PCR プレートもしくはチューブをサーマルサイクラにセットし、表 13 の PCR プログラムに従って、増幅を行います。この時点で使用しなかった、ビーズにキャプチャされた DNA のサンプルの残り半量 4°Cで一晩、あるいは長期であれば-20°Cで保存してください。

ここで次のステップで用いる AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 13 PCR プログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	98°C	2 minutes
Step 2	98°C	30 seconds
Step 3	60°C	10 seconds
Step 4	72°C	1 minute
Step 5		• Repeat Step 2 through Step 4 for a total of 8 to 11 times.
Step 6	72°C	10 minutes
Step 7	4°C	Hold

サイクル数の目安はキャプチャターゲットのサイズによって異なります。表 14 を参照してください。過剰な増幅が見られた場合、残り半量のビーズ結合サンプルから 1 サイクル減らして再度 PCR を行って下さい。

表 14 サイクル数

Capture Size	Cycles
1 Mb up to 3.2 Mb	11 cycles
> 3.2 Mb	10 cycles
All Exon	9 cycles

キャプチャ前の PCR 同様、キャプチャ後のサンプルの PCR 増幅のサイクル数も最小限にするようにしてください。もしくは別の確認方法として、以下の方法でテストランを行うことができます。PCR mix 溶液を各 10 uL の溶液量になるように3本に分けて、9, 10, 11 もしくは 12 サイクルをそれぞれ試します。この 10uL の反応液量のサンプルを次の STEP2 で AMPure XP ビーズで精製するにあたっては、30 uL の AMPure XP ビーズ溶液を用い、20 uL の Nuclease-free 水で溶出させます。続いて STEP3 でバイオアナライザを用いて、サイズと濃度の確認をします。サイクル数を最適化した後に、50 uL の量で再度 PCR を行ってください。

STEP 2. 増幅サンプルの Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。ヒートブロックを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
3. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、1.5mL の LoBind チューブに入れます。前項で調製した増幅済み DNA ライブラリ 約 50 uL を同じチューブに加えます。ボルテックスミキサでよく攪拌し、5 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 3~5 分間かかります)。
4. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70% エタノール溶液を各チューブに 500 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70% エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
6. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
7. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
8. チューブを磁石スタンドから外し、軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
9. サンプルチューブを 37°C のヒートブロックにセットして、5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
10. 20 uL の Nuclease-free 水もしくは 1x Low TE Buffer を加え、ボルテックスミキサでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。
11. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
12. 上澄み液 約 20uL を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4°C で一晩、それ以上の長期であれば -20 °C で保管することができます。

STEP 3. 品質評価

キャプチャされ、精製したライブラリの収量とサイズ分布をバイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを用いて測定します。

NOTE

バイオアナライザの代わりに High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5584) と High Sensitivity D1000 試薬キット (Agilent p/n 5067-5585) を使用する方法も選択できます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して下さい。

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

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

CAUTION

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースライン不安定を引き起こすことがあります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1 uL に 1x TE を数 uL 加えて希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1 uL とって測定することをお勧めします。また、従来の In solution PCR 法(プロトコル ver1.4 以前)からオンビーズ PCR 法(プロトコル ver1.5 以降)に切り替えた場合、同じ PCR サイクル数で増幅しても収量が多くなる傾向があります。従来よりも高い希釈率を適用しないと、バイオアナライザの定量範囲から外れる場合がありますのでご注意ください。

希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。ピークの濃度をバイオアナライザのスミアアッセイ機能を用いて、測定します。
8. サンプルのサイズが異なる場合、次の”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”に進む前に、“Step5 E-gelによるサイズ選択”を実施します。その場合、Step 4の後再度 Step 5のサイズ選択を実施する必要はありません。

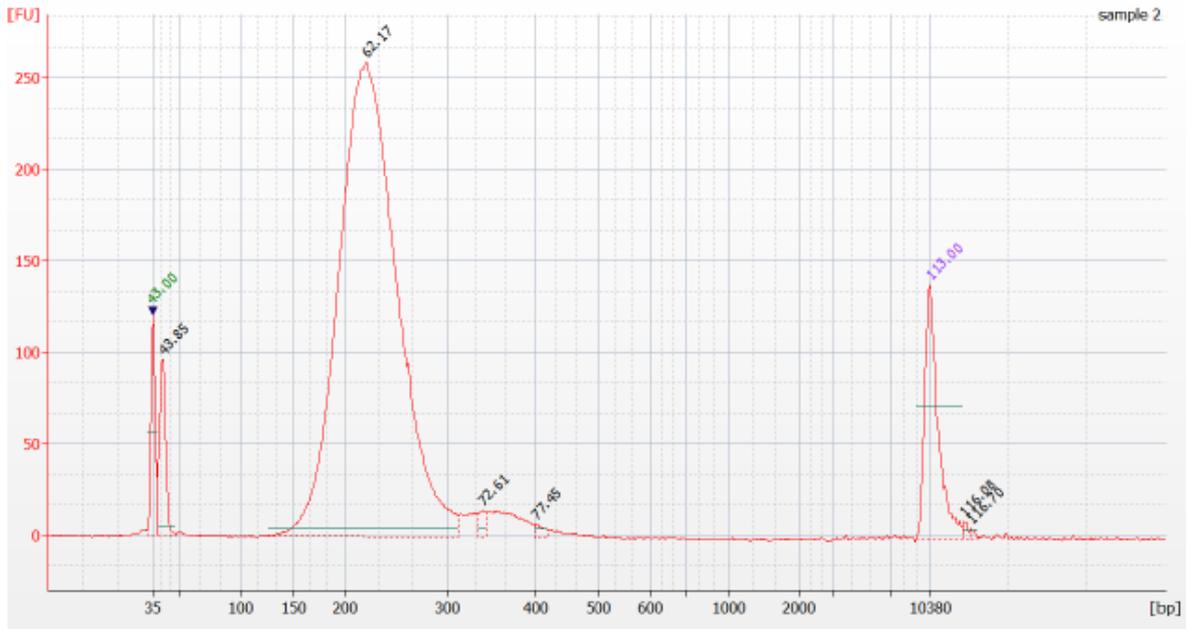


図 8 High Sensitivity DNA キットを用いたキャプチャライブラリの定量とサイズ確認
約 220 bp のサイズに、シングルピークのピークトップが観察される。プライマーダイマーはその後のゲルによるサイズ選択によって除去されることが期待されるため、この時点で 40 bp 付近にピークが見られても問題ありません。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4℃で一晩、それ以上の長期であれば -20℃で保管することができます。

STEP 4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

最適な濃度はお使いの Ion Proton の Version によって異なる可能性がありますので、必ずライフテクノロジー社の提供する最新のプロトコルをあわせて参照ください。本プロトコルに記された DNA の最終的な濃度は、プロトコルのアップデートにより変わることがありますので、事前にご確認ください。

1. プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、バーコードサンプルをプールするための量を計算します。

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例: Ion Proton プロトコルでは 10 nM

(E-gel の操作時に視覚的に確認するためには、10 nM 以上の濃度にプールする必要があります)

#: プールするインデックスバーコードタグの数

C(i): 各バーコードサンプルの初期濃度

表 15 に 2 つのバーコードタグ (それぞれ異なる初期濃度) の計算例を示します。最終的な容量 20 μL (10 nM の濃度) には 1x Low TE を用います。

表 15 トータル量 20 μL にする場合のインデックスタグ付きサンプルの混合例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use (μL)
Sample 1	20 μL	10 nM	10 nM	2	10
Sample 2	20 μL	12.5 nM	10 nM	2	8
1X Low TE Buffer					2

2. 最終的に必要な液量になるように調整を行います。
 プールしたバーコード付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より少ない場合、1X Low TE Buffer を用いて総量が最終的に必要な液量になるように調整します。
 プールしたバーコード付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して最終的に必要な液量とします。
3. 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween 20 を 0.1%(v/v)の濃度になるように加えて-20°Cで短期間保存できます。

STEP 5. E-Gel によるサイズ選択

この章では、[integrated E-Gel system](#) を使ったアガロースゲル電気泳動によるサイズ選択の基本的な手順を説明します。

1. [integrated E-Gel system](#) の準備：
 - a. [Safe Imager Real-Time Transilluminator](#) の上に [E-Gel iBasePower System](#) を置きます。
 - b. [Safe Imager Real-Time Transilluminator](#) の短い電気コードを [E-Gel iBase Power System](#) の電源インレットにつなぎます。
 - c. [Safe Imager Real-Time Transilluminator](#) からコンセントへ電源コードをつなぎ、両機器の電源を入れます。
2. [E-Gel iBase Power System](#) の矢印ボタンを使って **SizeSelect™ 2%** プログラムを選択します。もしプログラムが使用できない場合、ファームウェアをアップデートしてください。詳しくは E-Gel ユーザマニュアルの“Downloading Firmware Upgrades”に記載してあります。
3. パッケージから [E-Gel SizeSelect 2% Agarose Gel](#) を取り出し、慎重にカセットから両方のコームを外します。
4. ゲルカセットの右側にある 2 つの電極が [the E-Gel iBase Power System](#) の 2 つの電極接続に接するように、[E-Gel iBase Power System](#) の 2 つの電極接続へカセットをスライドさせます。次にカセットの左側を押し下げてください。カセットを適切にはめると LED ライトが赤く光ります。ゲルの Pre-Run はしないでください。
5. ウェルに各サンプルを 20 uL ロードします。ゲルの端にあるウェルは泳動が遅くなり、サイズの選抜に影響を与える恐れがあるため使用しないでください。また、ラダーの隣のウェルも使用しないでください。
6. [1 × Low TE Buffer \(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA\)](#) に溶解している 1 µg/µL 50 bp DNA Ladder を 25 ng/µL に希釈します。希釈した DNA ラダー 10 µL (250 ng) を中央の小さなウェル (Lane M) に加えます。
7. Top row の使用しないウェルに Nuclease-free 水を 25 uL、小さい中央のウェルに Nuclease-free 水 10uL を加えます。
8. Bottom row の大きいウェルに 25 uL、中央の小さなウェル (Lane M) に 10 uL の Nuclease-free 水を加えます。
9. [E-Gel iBase Power System](#) の上に Amber filter ユニットを置きます。
10. Mode を押してランタイムを 11~13 分に設定します。このシステムに使い慣れていなければ、より短いランタイムを選んで下さい。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

11. 電気泳動を開始するために E-Gel iBase Power System の Go を押します。赤色のライトが緑色にかかります。
12. PCR 産物のバンドがゲルのリファレンスラインに達するまでサンプルを流します。
13. PCR 産物がリファレンスラインに達する前に泳動が止まってしまった場合、泳動時間を 2-3 分の範囲内に設定して、Step10 から Step12 の作業を繰り返します。
14. E-Gel iBase Power の Go を押して、電気泳動を終了します。
15. ランタイムを 1-2 分に設定し直して Go を押し、電気泳動を再開させます。PCR 産物とラダーの 200 bp のバンドの移動を注意して追ってください。目的としているターゲット選択サイズは期待される PCR 産物と同様の約 220bp です。
16. PCR 産物のバンドがコレクションウェル内に移動して来たとき、Go を押して、電気泳動を止めます。
17. ウェルの底を突き抜けないように注意して、コレクションウェルから溶液約 10 uL をピペットを使って回収し、新しいチューブに回収します。
18. 溶液の総量を 20 uL に調整します。

STEP 6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。ヒートブロックを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
3. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液をサンプルの 1.8 倍量 (36 uL) 用意し、1.5mL の LoBind チューブに入れます。前項で調製したアダプター付加後の DNA サンプル 約 20 uL を同じチューブに加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、5 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります)
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
9. チューブを磁石スタンドから外し、軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
10. サンプルチューブを 37°C のヒートブロックにセットして、5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
11. 25 uL の Nuclease-free 水を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。
12. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
13. 上澄み液 約 25 uL を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

STEP 7. 品質評価

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

NOTE

バイオアナライザの代わりに High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5584) と High Sensitivity D1000 試薬キット (Agilent p/n 5067-5585) を使用する方法も選択できます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して下さい。

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

CAUTION

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースライン不安定を引き起こすことがあります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1 μ L に 1x TE を数 μ L 加えて希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1 μ L とって測定することをお勧めします。収量が多い場合、高い希釈率を適用しないと、バイオアナライザの定量範囲から外れる場合がありますのでご注意ください。

希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 220 bp にシングルピークのピークトップがあることを確認します。また PCR の非特異的増幅産物がないかどうか確認します。この、約 220 bp の位置のシングルピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。

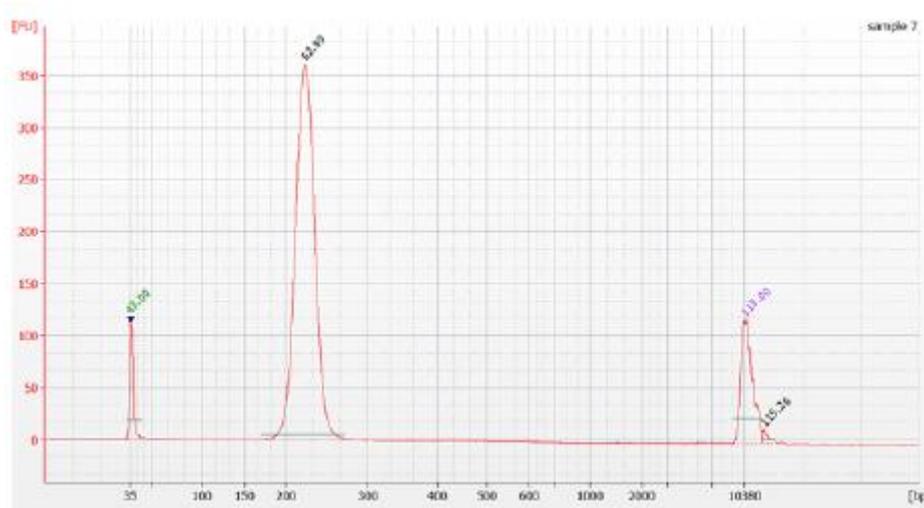


図 9 High Sensitivity DNA キットを用いたキャプチャライブラリの定量とサイズ確認
約 220 bp のサイズに、シングルピークのピークトップが観察される。

Stopping Point

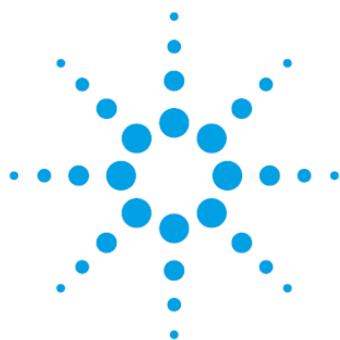
次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4°Cで一晩、それ以上の長期であれば -20 °Cで保管することができます。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

STEP 8. シーケンスのテンプレートを準備する

Ion PI Template OT2 200 Kit v2 と Ion PI Sequencing 200 Kit v2 を Ion OneTouch 2 System と共に使用し、シーケンスのテンプレートを準備してください。

5. リファレンス



この章では、リファレンス情報について説明します。

5. リファレンス

試薬一覧

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

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

表 16 SureSelect キット 構成試薬一覧

Product	Storage Condition	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect Target Enrichment Kit PTN Hyb Module Box #1	Room Temperature	5190-6542	5190-6543
SureSelect Target Enrichment Kit PTN Hyb Module Box #2	-20°C	5190-6514	5190-6515

次に、キットの内容について以下の表に示します。

表 17 SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 (室温保存) 内訳

Kit Component
SureSelect Hyb #1 (orange cap, or bottle)
SureSelect Hyb #2 (red cap)
SureSelect Hyb #4 (black cap, or bottle)
SureSelect Binding Buffer
SureSelect Wash 1
SureSelect Wash 2

表 18 SureSelect Target Enrichment Kit Ion Proton Box #2(-20°C保存)内訳

Kit Component
SureSelect Hyb #3 (yellow cap)
SureSelect PTN Block #1 (green cap)
SureSelect Block #2 (blue cap)
SureSelect PTN Block #3 (brown cap)
SureSelect RNase Block (purple cap)
SureSelect PTN PCR primer mix (clear cap)

5. リファレンス

その他のキットに含まれる試薬

以下の試薬は SureSelect Target Enrichment Kit 以外のキットに含まれます。この表に示された試薬もしくはバイオアナライザのキットを使うようにしてください。

表 19 Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent)

Component
DMSO (green cap)
5× Herculase II Rxn Buffer (clear cap)
100 mM dNTP Mix (green cap)
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)

表 20 Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies p/n 4471269)

Components
Ion Shear Plus Enzyme Mix
Ion Shear Plus 10x Reaction Buffer
Ion Shear Plus Stop Buffer
10x Ligase Buffer
DNA Ligase
Adapters
Nick Repair Polymerase
dNTP Mix

表 21 Ion Xpress Barcode Adapters Kit

Component
Ion Xpress P1 Adapter
Ion Xpress Barcode 1 through 16

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて

SureSelect のハイブリダイゼーションでは、27-29 uL という少量の溶液を 16 時間(以上)にわたってハイブリダイゼーションするため、蒸発を防ぐことが大切です。必ず、使用を予定している手持ちのサーマルサイクラ、ウェルプレート、チューブ、キャップ、シールで事前にテストを行ってください。(p.27 参照)

下記の表 22 は、これまでにアジレント社で確認している、蒸発を抑えられる組み合わせになります。これらの組み合わせで用いる場合であっても、必ず事前にテストをしてからハイブリダイゼーションに用いください。またキャップの密閉がゆるいと、この組み合わせであっても液が蒸発してしまうので、セットするときには念入りに注意してください。

表 22 蒸発を抑えられることが過去に確認された組み合わせ

PCR Machine	Plate/Strips	Cover	Comments
Agilent Mx3005P QPCR	Mx3000P Strip Tubes (401428)	MX3000P Optical Strip Caps (401425)	Heated Lid
Agilent Mx3005P QPCR	MicroAmp Optical 96-well reaction plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
ABI GeneAmp 9700	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Caps (8caps/strip) (N801-0535)	Heated Lid
ABI Veriti (4375786)	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf 8-Tube PCR Tubes	Attached lids	Lid heating set to 75°C
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent strip tubes 410022 (Mx4000)	Agilent Optical cap 410024 (Mx4000)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent strip tubes 410022 (Mx4000)	Agilent Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent 96-well Plate 410088 (Mx3000/3005)	Agilent Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid

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

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

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

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

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* 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。