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

イルミナペアエンドマルチプレックス
シーケンス対応キット

和文プロトコル

Protocol Version F0 対応
［2022 年 9 月版　和文］

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

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2017 - 2022
本マニュアルのいかなる部分も、米国および国際著作権法に準拠する Agilent Technologies, Inc. からの事前の合意および書面による同意なしに、いかなる形式または手段（電子的保存および検索または他の言語への翻訳を含む）でも複製することはできません。

確認

Oligonucleotide sequences © 2006, 2008, and 2011 Illumina, Inc. 無断複写・転載を禁じます。
イルミナシーケンサーシステムおよび関連するアッセイでのみ使用できます。

保証

本書に含まれる資料は「現状有姿」で提供され、将来の改版に際しては、予告なしに変更される可能性があります。さらに、適用法で認められる最大限の範囲で、Agilent は、本書および本書に含まれる情報に関して、明示または黙示を問わず、商品性および特定目的への適合性の黙示の保証を含むがこれらに限定されない、すべての保証を否認します。Agilent は、本書または本書に含まれる情報の提供、使用またはパフォーマンスに関連するエラーまたは偶発的もしくは間接的な損害について責任を負わないものとします。Agilent とユーザーが、本書の内容と矛盾する保証条件を別個の契約書として結んでいる場合は、別個の契約書の保証条件が優先されます。

技術ライセンス

本書に記載されているハードウェアおよび/またはソフトウェアはライセンスに基づいて提供されており、そのようなライセンスの条件に従ってのみ使用またはコピーすることができるとされている場合があります。

制限付き権利の説明文

米国政府の制限付き権利。連邦政府に付与されたソフトウェアおよび技術データの権利には、エンドユーザーの顧客に通常提供される権利のみが含まれます。Agilent は、FAR 12.211（Technical Data）および 12.212（Computer Software）に準拠して、また国防総省に対しては DFARS 252.227-7015（Technical Data - Commercial Items）および DFARS 227.7202-3（Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation）に準拠して、ソフトウェアおよび技術データにおける上記通常の商用ライセンスを提供します。

ご購入者への通知

本製品は、Bio-Rad Laboratories と Agilent Technologies, Inc.との間の契約に基づいて提供されており、本製品の製造、使用、販売または輸入は、Bio-Rad Laboratories 社が所有する U.S. Pat. No. 6,670,808 の対象となります。本製品の購入により、ご購入者には、ご購入頂いた量の本製品および本製品の成分を PCR（ただし、リアルタイム PCR は除く）においては研究分野（法医学、動物実験、食品検査を含む、すべての応用研究分野を含む）で使用し、またリアルタイム PCR においては診断および予後分野で使用する譲渡不可能な権利が与えられます。本製品を、すべての応用研究分野（法医学、動物実験、食品検査を含むがこれらに限定されない）を含む研究分野に

おいてリアルタイム PCR に使用する権利は与えられていません。

CAUTION

CAUTION 表示は危険性を示します。正しく実行または遵守されなかった場合に、製品の損傷や重要なデータの損失につながる可能性のある操作手順や方法などを示しています。CAUTION 表示の個所は、その条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

WARNING

WARNING 表示は危険性を示します。正しく実行または遵守されなかった場合に、事故や重大な怪我につながる可能性のある操作手順や方法などを示しています。WARNING 表示の個所は、その条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、使用プロトコルについて、弊社までお問い合わせいただきますようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の SureSelect XT Low Input Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Version F0, September 2022 [G9703-90000] に対応しています。
このプロトコルでは、アジレント SureSelect XT Low Input Reagents を用い、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ライブラリを調製し、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。本プロトコルでは、ターゲット領域をキャプチャ・増幅する前に、インデックスライブラリに分子バーコードを付加します。

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

本資料は、SureSelect XT Low Input 試薬キットを使用して、イルミナ社のターゲットエンリッチしたペアエンドマルチプレックスシーケンシングライブラリを作製するためのプロトコルです。

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. インプット DNA の準備と断片化

この章では、ライブラリ調製に先立って、ゲノム DNA （gDNA） を酵素あるいは機械を用いて断片化する手順について説明しています

3. サンプルの調製

この章では、ターゲットエンリッチメントする前の、インデックスと分子バーコードを含む gDNA シーケンスライブラリを調製する手順について説明しています。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

この章では、調製した DNA ライブラリに 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. キャプチャ後のマルチプレックスシーケンスのためのサンプル調製

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 から抽出した gDNA サンプルを使用する場合に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品やインデックスの配列などの参照情報を記載しています。

これまでのバージョンでの変更点

Ver.F0 での変更点

- SureSelect XT HS Human All Exon V8+UTR と SureSelect XT HS Human All Exon V8+NCV の各プローブに対応しました （p. 12 の表 3)。
- プレデザインの SureSelect プローブの Design ID 情報を追加しました （p. 12 の表 3)。
- サーマルサイクラにおける cap strip の推奨について、domed cap に加えて flat cap が追加されました （p. 13 の表 5、p. 11、p. 46、p. 49、p. 54)。
- 酵素による断片化のステップ 1. の手順において DNA サンプルの溶媒として 1X Low TE Buffer の使用オプションを追加しました （p. 23)。
- 24 回分の反応に推奨される試薬量を更新しました （p. 27 の表 15 および p. 28 の表 17)。
- 経験豊富なユーザ向けの新しい AmpPure XP ビーズ精製プロトコルパラメータ概要表を追加しました （p. 31 の表 19、p. 36 の表 24 および p. 55 の表 35)。
- クロスプラットフォーム間のインデックス同等性についての注記を追加しました （p. 33)。
- シーケンスサポート情報を更新しました。主な更新内容は以下の通りです （p. 63 ～ 76)。
    - Illumina の BCL Convert ソフトウェアを使用したデマルチプレックスに関するガイドライン （p. 65）
    - AGeNT v3.0 LocatIt ツールに代わる新しい CReaK ツールへの対応（p. 76）
- SureSelect XT Low Input DNA ライブラリのシーケンス前処理およびヒト生殖細胞 DNA バリアント解析における Agilent Alissa Reporter ソフトウェアをサポートに追加しました （p. 66 および p. 74)。
- SureSelect Wash Buffer 2 の効率的な加熱のためのサーマルサイクラーブロック構成要件について、トラブルシューティングを更新しました （p. 90)。

Ver.E1 での変更点

- Support for SureSelect XT HS Human All Exon V8 プローブに対応しました（p. 12 の表 3)。
- p. 44 の表 26 の更新と、章全体の細かい更新を含む「ハイブリダイゼーションとキャプチャ」の章を更新しました （p. 42～ p. 50)。
- Initial FFPE DNA サンプル断片サイズが最終的なライブラリ断片サイズ分布に与える影響について、p. 20 の Note および p. 23 の表 12 脚注を更新しました。

Ver.E0 での変更点

- 酵素による断片化のプロトコルを追加しました （p. 23 ～ p. 24、p. 78 の表 38、p. 81 の表 41 および p. 88 のトラブルシュートガイド)。
- Input DNA の準備と機械を用いた断片化に関する情報を含む「Input DNA の準備と断片化」の章を追加しました （p. 16 ～)。
- 章全体の細かい更新を含む「ハイブリダイゼーションとキャプチャ」の章を更新しました （p. 44 の Note、p. 44 のステップ 3、p. 45 のステップ 5 および p. 48 のステップ 1)。
- SureSelect XT システムで使用するために設計されたプローブのハイブリダイゼーション温度に関する説明を追加しました （p. 44 の表 26 脚注)。
- 分子バーコードオプション使用のサポートに関して更新しました （p. 65、p. 63 の図 14 凡

例および p. 65 の Note)。

- シーケンスプラットフォームおよびキットのサポート情報を更新しました （p. 64 の表 37)。
- 小容量の分光光度計を追加しました（p. 13 の表 5)。
- Flat cap strip についての説明を更新しました（p. 14 の表 7)。

内容

1. はじめに 9

プロトコル概要 10

操作に関する注意 11

安全に関する注意 11

実験に必要な試薬 12

2. インプット DNA の準備と断片化 16

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認 17

Fresh なサンプルからの高品質 gDNA の調製 17

FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認 17

STEP2. DNA の断片化 20

方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化 20

方法 2：酵素による断片化 23

3. ライブラリの調製 25

STEP1. 末端修復と dA 付加 26

STEP2. 分子バーコードアダプターのライゲーション 30

STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 31

STEP4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅 33

STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製 36

STEP6. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量 38

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ 42

STEP1. DNA サンプルのキャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション 43

STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製 48

STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 49

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 51

STEP1. キャプチャライブラリの増幅 52

STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製 55

STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認 57

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 61

STEP5. シーケンスサンプルの調製 63

STEP6. シーケンスの開始とデータ解析 65

6. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用 77

FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更 78

FFPE サンプルの品質確認 78

FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨 79

7. リファレンス 80

キット内容 81

SureSelect XT Low Input インデックスの塩基配列 86

トラブルシュートガイド 88
クイックリファレンス 92

1. はじめに

プロトコル概要　10
操作に関する注意　11
安全に関する注意　11
実験に必要な試薬　12

最新のプロトコルを参照してください。
実験を始める前にこの章の内容を確認し、必要な機器や試薬をご準備ください。

Agilent SureSelect Cancer All-In-One assay のライブラリを調製するには、本誌に記載されているプロトコルを使用してください。SureSelect Cancer All-In-One Target Enrichment Product Overview Guide (G9702-90100) に記載されている注意事項にも沿ってください。

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ることをご了承ください。

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や、他の SureSelect のプロトコルと異なる点がありますのでご注意ください。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にご注意下さい。

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があります。

プロトコル概要

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を図 1 に示します。各ステップに要する時間は表 1 にまとめられています。

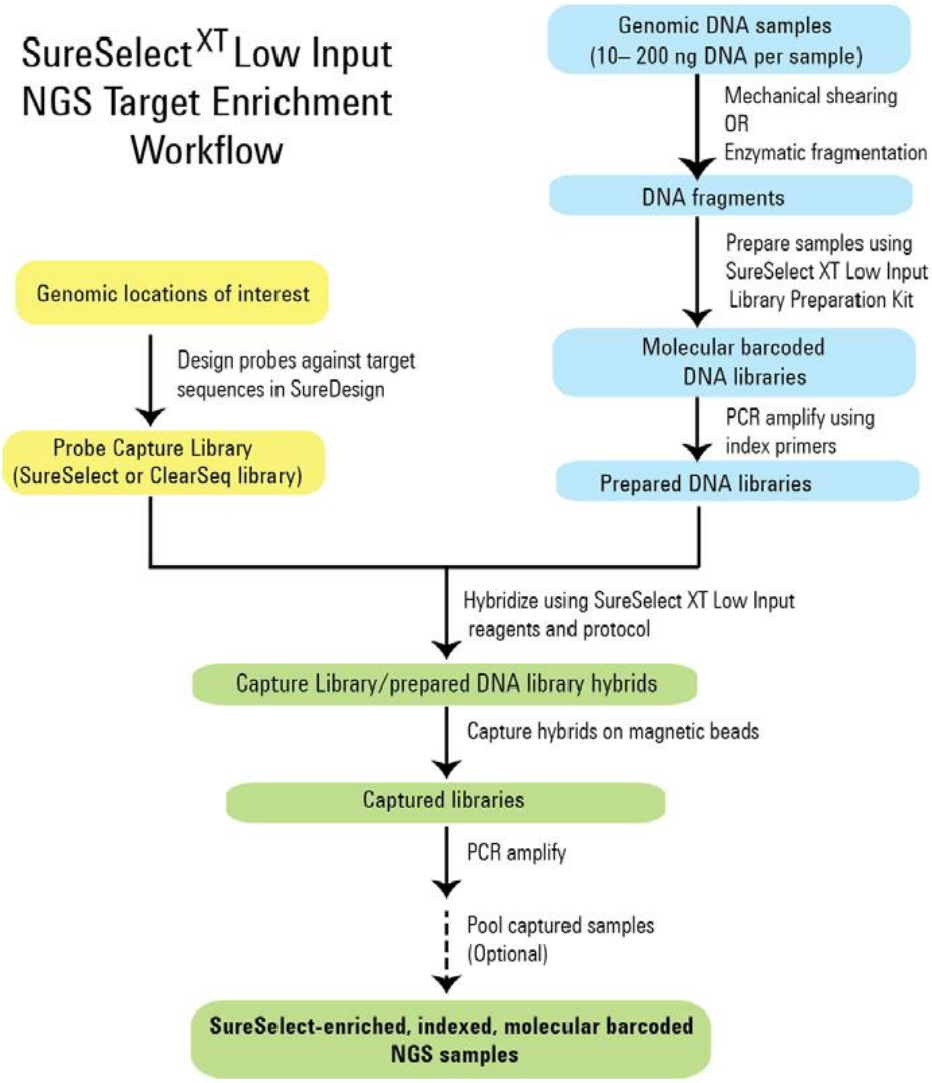


図 1　ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー

表 1　各ステップの所要時間　概略　（16 サンプルまでの場合）

ステップ	時間
ライブラリ調製	3.5 時間
ハイブリダイゼーションとキャプチャ	3.5 時間
キャプチャ後の増幅	1 時間
増幅後の Bioanalyzer・TapeStation による QC およびサンプルのプール	1.5 時間

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下さい。
    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 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、キャップ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。
- Biosafety Level 1 (BSL1) のルールに基づき、実験を行います。
- プロトコル中に表記されている Stopping Point でサンプルを-20 °C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。
- gDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けてください。

安全に関する注意

CAUTION

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

実験に必要な試薬

表 2　必要な試薬　（全サンプルタイプ）

SureSelect XT Low Input 試薬キット （Cancer All-In-One Lung、Cancer All-In-One Solid Tumor は試薬キットとキャプチャライブラリのセット品となります）					
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, NovaSeq 6000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。

表 3　キャプチャプローブ

SureSelect キャプチャライブラリ				
品名	**製造メーカー**	16反応分	96反応分	
設計済みキャプチャライブラリ				
SureSelect XT HS Human All Exon V8	Agilent	5191-6873	5191-6874	
SureSelect XT HS Human All Exon V8 + UTR	Agilent	5191-7401	5191-7402	
SureSelect XT HS Human All Exon V8 + NCV	Agilent	5191-7407	5191-7408	
SSel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7	Agilent	5191-4028	5191-4029	
SureSelect XT HS Human All Exon V6	Agilent	5190-8863	5190-8864	
SureSelect XT HS Human All Exon V6 + UTRs	Agilent	5190-8881	5190-8882	
SureSelect XT Clinical Research Exome V2	Agilent	5190-9491	5190-9492	
ClearSeq Comprehensive Cancer XT	Agilent	5190-8011	5190-8012	
カスタムプローブ*				
SureSelect カスタム Tier1 1 – 499 kb	Agilent	SureSelectカスタムプローブはカスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。		
SureSelect カスタム Tier2 0.5 – 2.9 Mb	Agilent			
SureSelect カスタム Tier3 3.0 – 5.9 Mb	Agilent			
SureSelect カスタム Tier4 6.0 – 11.9 Mb	Agilent			
SureSelect カスタム Tier5 12.0 – 24.0 Mb	Agilent			
設計済みキャプチャライブラリに追加する場合				
SSel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7 Plus1	Agilent	カスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。 詳しくはお問い合わせください。		
SSel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7 Plus2	Agilent			
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus1	Agilent			
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus2	Agilent			

本書のプロトコールは、SureSelect XT Low Input Reagent Kits + Target Enrichment Probesのバンドル版とも互換性があります。
p/n G9707A-SおよびG9708A-Sを使用してご注文ください。詳しくは86ページをご覧ください。

*2020年8月以降に設計されたカスタムプローブは、最新の製造プロセスで製造されています。デザインサイズのTierは製品ラベルに記載されています。2020年8月より前に設計・注文されたカスタムプローブは、従来の製造プロセスを使用して製造されており再注文が可能です。従来の製造プロセスの製品ラベルには、デザインサイズのTierは記載されていません。両方のカテゴリーのカスタムプローブは、プロトコルに記載されている同一の最適化されたターゲット濃縮プロトコルを使用します。

表 4　その他の試薬：すべてのサンプルタイプ・断片化方法

その他の試薬(すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法)					
品名	**製造メーカー**	**品番**	**指定/相当品**	**内容量**	**備考**
AMPure® XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter Genomics	A63880	指定	5 mL	大容量タイプ(60mL [A63881], 450mL [A63882])もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	65601	指定	2 mL	大容量タイプ(10mL [65602], 50mL [65604D]) もあります。
1xLow TE Buffer	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	10mM Tris-HCl, pH7.5 ～ 8.0, 0.1mM EDTA
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	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。

表 5　必要な消耗品・機器すべてのサンプルタイプ及び断片化方法

必要な機器、消耗品類(すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法)					
品名	**製造メーカー**	**品番**	**指定/相当品**	**内容量**	**備考**
サーマルサイクラー (96ウェル、0.2 mlブロック)			相当		HotTop使用 サンプル量が0.2 mL を超えるステップがあります。0.25 mL 以上入れられるプラスチックウェアに対応したサーマルサイクラーを使用してください。
サーマルサイクラーに適した プラスチックウェア： ・96-well tube plates または8-well strip tubes ・ドーム型のcap strips			相当		
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q33228	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タイプを使用ください。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンダウン用。卓上遠心機でも可能。(例：日本ミリポア　チビタンII)
96ウェルプレートもしくは 8 strip tubes 遠心機	KUBOTA または ワケンビーテック		相当		96ウェルプレートもしくは8 strip tubesのスピンダウン用 ・96ウェルプレート用：PlateSpin II (KUBOTA) ・8 strip tubes用：卓上遠心機 プチチェンジ(ワケンビーテック)
MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003428000	相当		ストレプトアビジンビーズ溶液がウェル内でよく混ざるように、1,400 – 1,800 rpmで30分以上Mix可能なもの。 フルスカート以外のPCRプレートや8 strip tubesで使用する場合は別売りのPCRプレートアタッチメントが必要。
MS3.5 96ウェルプレート用アタッチメント	IKA	0003428000	相当		フルスカート以外のPCRプレートや8 strip tubes使用時に上記MS3デジタルに装着して使用。
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12331D	相当		Dyna-Mag-96 (12331D) は96 well plate・8連チューブ兼用。 マグナスタンド [日本ジェネティクス](p/n FG-SSMAG2)も使用可 (8連チューブ用)。 注意：ウェルの一方に磁気ビーズが集まるタイプを必ず選んでください。リング状に磁気ビーズが集まるタイプは使用不可。
Tube-strip capping tool	Agilent	410099	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。
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体で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					

表 6　核酸の QC プラットフォーム – いずれかの装置を選んでください。

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**
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 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991AA / G2992AA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Agilent 2200 TapeStation, Agilent 4150 TapeStation [p/n G2992AA] の使用も可能です。
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。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer		M5310AA / M5311AA / M5312AA			
Agilent 4200/ 4150 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	
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	Agilent	5042-8502	指定		
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		
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。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer消耗品					
NGS Fragment Kit (1 – 6000 bp)	Agilent	DNF-473-0500	指定		
HS NGS Fragment Kit (1 – 6000 bp)	Agilent	DNF-474-0500	指定		

表 7　サンプルタイプ及び断片化方法により必要な機器および消耗品

サンプルタイプや断片化方法により必要な機器および消耗品					
品名	**製造メーカー**	**品番**	**指定/相当品**	**内容量**	**備考**
高品質なDNA （FFPE由来DNAサンプルには必要ありません）					
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304 (50サンプル) 51306 (250サンプル)	相当		高品質なgDNAを精製するシステム例
FFPE由来DNA（高品質なDNAサンプルには必要ありません）					
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 samples	Qiagen	56404 (50サンプル)	指定		FFPEからDNAを精製するシステム
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		
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。
gDNAを機械で断片化する場合（酵素による切断には使用しません）					
Covaris Sample Preparation System	Covaris （エムエス機器）	Model E220	指定		gDNAをロスなく再現性よく、かつ確実に150-200 bpの長さに断片化するために、Covarisの使用が指定されています。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		
gDNAを酵素反応で断片化する場合（機械による切断には使用しません）					
SureSelect Enzymatic Fragmentation System	Agilent	5191-4079 (16反応) 5191-4080 (96反応)	指定		

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**
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。
8x flat strip caps			相当		サーマルサイクラーを使用しないステップでチューブや96ウェルプレートに蓋をする際に使用します。
PlateLoc Thermal Microplate Sealer with Small Hotplate	Agilent	G5402A	相当		96 well plateのシールに使用。
Peelable Aluminium Seal for PlateLoc Sealer	Agilent	24210-001	相当		
MicroAmp Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4311971	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に計画して下さい。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。

※試薬はそれぞれの反応数分が入っています。

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

2. インプット DNA の準備と断片化

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認　17
Fresh なサンプルからの高品質 gDNA の調製　17
FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認　17
STEP2. DNA の断片化　20
方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化　20
方法 2：酵素による断片化　23

この章では、アジレントの SureSelect XT Low Input キットによるライブラリ調製とエンリッチメントの前に、インプット DNA サンプルの調製、品質確認、定量と断片化の手順について説明します。ここでは、機械を用いた断片化と酵素による断片化の 2 種類の断片化方法についてのプロトコルを記載しています。

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 だけでなく、FFPE サンプルからの低品質の DNA にもお使いいただけます。FFPE サンプルを使用する際の変更点は、プロトコルの各ステップに記載しています。FFPE サンプルを使用する際の変更内容のまとめは、p. 77 の「6. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用」を参照してください。

プロトコルでは、10 ～ 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。分子バーコードを用いた解析は、サンプル量が少ない場合（10 ～ 50 ng）、または小さなプローブデザインを用いて、非常に低いアレル頻度のバリアントを検出する場合に推奨されます。

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認

NOTE

Agilent SureSelect Cancer All-In-One assay の DNA サンプルを調製する場合は、本項目に記載されている gDNA サンプル調製の方法の内容に以下の変更を行ってください。

- 実験デザインで必要な場合は、実験サンプルとともにリファレンス DNA も必ず調製してください。
- 最良の結果を得るには 50 ng 以上のインプット DNA をお使いください。

詳しくは G9702-90100 を参照してください。

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。プロトコルでは 10 ～ 200 ng のインプット DNA が必要です。

NOTE

gDNA サンプルが、OD260 / 280 の値が 1.8 ～ 2.0 であり、高品質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確認してください。
   Fresh な生物試料に由来する DNA サンプルについては、追加の品質確認は必要ありません。
   p. 20 の「STEP2. DNA の断片化」に進んでください。

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、ΔΔCq 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。ΔΔCq 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨は表 8 を確認してください。

a. 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参照してください。
b. 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μL 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参照してください。
c. ΔΔCq DNA 分解度スコア≦1 のサンプルは、すべてステップ 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。
d. ΔΔCq 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 8　ΔΔCq DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT Low Input における DNA インプット量の決定

Protocol Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples	
		ΔΔCq≤1*	ΔΔCq >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

* ΔΔCq 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 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。

a. 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。
b. 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参照してください。
c. DIN の値をもとに、表 9 の内容を参照して各サンプルのインプット量を決定してください。

表 9　DNA Integrity Number（DIN）の値に基づく、SureSelect XT Low Input 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。

STEP2. DNA の断片化

方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化

このステップでは、50 μL 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

本プロトコルでは 150 ～ 200 bp を DNA 断片化のターゲットサイズとし、Covaris model E220 装置および 130 μL 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、もしくは使用する NGS ワークフローが異なる DNA 断片のサイズを必要とする場合 （例：SureSelect Cancer All-In-One Assay を用いた translocation 検出）、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。

NOTE

FFPE DNA サンプルの場合、最初の DNA サイズが断片化後のサイズ分布に影響し、記載されている目標範囲より短い断片サイズになることがあります。全ての FFPE サンプルは、ライブラリ構築に適したフラグメントを生成するために 240 秒間の断片化を行う必要があります （p. 21 の表 10）。FFPE サンプルから調製したライブラリは、最終的なライブラリ断片サイズ分布に適した NGS リード長を使用して解析する必要があります。

1. コバリス E220 を起動します。
   a. 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。
   b. 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。
   c. コントロールパネル上で、Degas （脱ガス） ボタンを押します。製造元の推奨に従い装置の脱ガスを行います （通常 30 ～ 60 分ほどです）。
   d. 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 ～ 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。

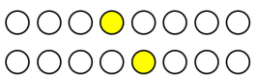
   コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照してください。

2. 断片化用の各 gDNA サンプル 10 ～ 200 ng を 1X Low TE Buffer （10 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.0, 0.1 mM EDTA） で最終量 50 μL となるよう調整します。
   よくボルテックスして混合し、スピンダウンして液を底に集めます。サンプルは氷上で保存します。

NOTE

断片化する DNA を水で希釈しないでください。水に溶解したサンプルを断片化すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が下がります。

3. 各 gDNA サンプルを、下記の手順にて断片化します。
   a. 先がテーパー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 µL の DNA サンプルを Covaris microTUBE に移します。
   b. 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ダウンします。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おそれがあります。

   c. サンプルを入れた microTUBE を、コバリスのチューブフォルダにセットします。表 10 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 10　Covaris E-series 装置による断片化設定条件　（SonoLab software v7 以降）

Setting	High-quality DNA	FFPE DNA
Duty Factor	10%	10%
Peak Incident Power (PIP)	175	175
Cycles per Burst	200	200
Treatment Time	2 × 120 seconds	240 seconds
Bath Temperature	2° to 8° C	2° to 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で、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 µL）　を、新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します　（この後のステップで、選択したチューブサイズに適合したビーズ分離用のマグネットが必要となります）。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、ステップ f のチューブに移します。

NOTE このステップでは、特に少量の DNA サンプルを取り扱う時、インプット DNA のロスを避けることが重要です。microTUBE の中を見て、すべてのサンプルを移したことを確認してください。もし水滴が残っていたらステップ g を繰り返してください。

この 50 µL の断片化 DNA サンプルを用い、末端修復と dA 付加から始まる NGS シーケンスライブラリを調製します。p. 25 の 「3. ライブラリの調製」 に進んでください。

NOTE このステップは stopping point ではありません。ライブラリ調製前の断片化サンプルの評価はせずに、このまま末端修復と dA 付加に進んでください。

方法 2：酵素による断片化

このステップではアジレントの SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit を使用して gDNA サンプルを断片化します。

1. 使用するサーマルサイクラに対応したチューブあるいは PCR プレートに、10 ～ 200 ng の gDNA を最終量 7 µL になるように Nuclease free water もしくは 1X Low TE Buffer で調製します。DNA 濃度が低すぎて、断片化に必要な 10 ～ 200 ng の DNA インプット量を 7 µL に調整できない場合、適切な濃縮方法を用いてサンプル量を減らすことができます。濃度が低いサンプルに対するプロトコルの修正については、p. 88 のトラブルシューティングを参照してください。
2. 5X SureSelect Fragmentation Buffer を融解し、ボルテックスで混合して氷上に置きます。
3. サーマルサイクラのサーマルプログラムを表 11 のように設定します。プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 11　酵素による断片化のサーマルサイクルプログラム※

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	Varies–see 表 12
Step 2	65°C	5 minutes
Step 3	4°C	Hold

サーマルサイクルプログラムの反応液量は 10 µL に設定してください。

断片化条件は、NGS のリード長によって異なります。下の表 12 を参照し、サンプルタイプと設定予定の NGS リード長に適した 37 °Cのインキュベーション時間を選択してください。

表 12　サンプルタイプと NGS リード長別の断片化時間

NGS read length requirement	Target fragment size	Duration of 37°C incubation step (表 11)	
		High-quality DNA samples	FFPE DNA samples*
2 ×100 reads	150 to 200 bp	15 minutes	15 minutes
2 ×150 reads	180 to 250 bp	10 minutes	15 minutes

* FFPE 由来 DNA は、初期 DNA の断片サイズが切断処理後の断片サイズに影響があり、表に示したターゲットサイズより短くなることがあります。すべての FFPE サンプルは、ライブラリ構築に適した断片末端にするために 37 °Cで 15 分インキュベートする必要があります。FFPE 由来サンプルから調製したライブラリは、最終的なライブラリのサイズ分布に適した NGS リード長で分析する必要があります。

4. 表 13 を参照し、Fragmentation Master Mix を調製します。
   ピペッティングを 20 回行うか、チューブに蓋をして高速で 5 ～ 10 秒ボルテックスしよく混合します。泡を除くために軽くスピンダウンし氷上に置きます。

表 13　Fragmentation マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
5X SureSelect Fragmentation Buffer (blue cap)	2 µl	18 µl	50 µl
SureSelect Fragmentation Enzyme (green cap)	1 µl	9 µl	25 µl
Total	3 µl	27 µl	75 µl

5. Fragmentation Master Mix 3 µL を 7 µL の DNA が入っている各サンプルウェルに添加します。
6. ピペッティングを 20 回行うか、チューブに蓋をして高速で 5 ～ 10 秒ボルテックスしよく混合します。軽くスピンダウンします。
7. すぐにサンプルチューブあるいは PCR プレートをサーマルサイクラにセットし、スタートボタンを押し表 11 のサーマルプログラムを開始します。
8. サーマルプログラムが 4 °C Hold のステップになったら、サンプルをサーマルサイクラから取り出し、40 µL の Nuclease free water を各ウェルに添加後、氷上に置きます。

この 50 µL の断片化 DNA サンプルを用い、NGS シーケンスライブラリ調製のための末端修復と dA 付加を行います。p. 25 の 「3. ライブラリの調製」 に進んでください。

NOTE

このステップは stopping point ではありません。ライブラリ調製前の断片化サンプルの評価はせずに、このまま末端修復と dA 付加に進んでください。

3. ライブラリの調製

STEP1. 末端修復と dA 付加　26
STEP2. 分子バーコードアダプターのライゲーション　30
STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製　31
STEP4. アダプター付き DNA ライブラリの増幅　33
STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製　36
STEP6. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量 38

この章では、アジレントの SureSelect XT Low Input キットを用い、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シーケンスする DNA ライブラリを調製する方法を説明します。各サンプルに、それぞれインデックスと分子バーコードを付加します。SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントのワークフロー概要は p. 10 の図 1 をご覧ください。

このステップは、機械を用いた断片化 （p. 20 ～ 22） あるいは酵素による断片化 （p. 23 ～ 24） を行った DNA サンプルを用いて NGS ライブラリを調製するプロトコルです。いずれの方法でも、50 µL の容量に 10 ～ 200 ng の断片化 DNA が含まれています。

STEP1. 末端修復と dA 付加

このステップでは表 14 に示す試薬を使用します。表に記載されている各試薬を溶かして混合します。

p. 31 のステップで使用する AMPure XP ビーズを、少なくとも 30 分前までに冷蔵保存から室温に移します。ビーズは絶対に凍らせないでください。

表 14　使用前に溶かして置く試薬

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	page 28
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	page 27
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	page 28
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	page 27
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	page 30

複数のサンプルを処理する場合は、各ステップで余剰分を含めて作製してください （DNA サンプル以外)。各表には、余剰分を含んだ 8 反応分または 24 反応分のマスターミックス量が記載されています。

1. 末端修復反応の開始前に、Ligation Master Mix を調製し、使用まで室温に置きます。
   a. 融解した Ligation Buffer を高速のボルテックスで 15 秒攪拌し均一にします。

CAUTION

このステップで使用する Ligation Buffer は粘性が非常に高いです。マスターミックスの調製前に、高速のボルテックスで 15 秒攪拌します。他の溶液と混合する際は、混合液の少なくとも 80 %の液量に設定したピペットでピペッティングを 15 ～ 20 回繰り返すか、高速のボルテックスで 10 ～ 20 秒攪拌し、よく混合してください。
プロトコルを通して、チューブあるいは PCR プレートをボルテックスする際は、上部が平らなボルテックスミキサを使用してください。ボルテックスで溶液を混合するときは、十分混合されていることを目視で確認してください。

   b. 表 15 の試薬を混合し、適切な量の Ligation Master Mix を調製します。

      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。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 回繰り返すか、もしくはチューブの蓋をシールして高速のボルテックスで 10 ～ 20 秒攪拌し、よく混合します。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集めます。

      p. 30 ステップ 1 の工程で使用する前に 30 ～ 45 分、室温に置きます。

表 15 Ligation Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions* (includes excess)	Volume for 24 reactions* (includes excess)
Ligation Buffer (bottle)	23 µl	207 µl	598 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	18 µl	52 µl
Total	**25 µl**	**225 µl**	**650 µl**

* 96 反応キットでの 1 回あたりの最少推奨反応数は 24 反応です。キットには 24 サンプルを 4 回実験する分の量が含まれます。

2. 末端修復および dA 付加するために、サーマルサイクラのプログラムを表 16 の内容に設定します （蓋は加熱します）。プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、ステップ 6 でサンプルを入れるまで、一時停止したままにします。

表 16　末端修復および dA 付加のサーマルプログラム*

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	72°C	15 minutes
Step 3	4°C	Hold

* サーマルプログラムでの反応量は 70 μL に設定してください。

3. 溶解した End Repair-A Tailing 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。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で 15 秒間、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 回繰り返すか、もしくは高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、よく混合してください。

4. 表 17 を参照し、適切な量の End Repair-A Tailing Master Mix を調製します。
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。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 回繰り返すか、もしくはチューブの蓋をシールして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、よく混合します。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 17　End Repair/dA-Tailing Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	16 µl	144 µl	416 µl
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µl	36 µl	104 µl
Total	**20 µl**	**180 µl**	**520 µl**

5. 50 μL の断片化 DNA の入った各サンプルチューブ （well） に 20 μL の End Repair-A Tailing Master Mix を加えます。60 μL に設定したピペットでピペッティングを 15 ～ 20 回繰り返すか、もしくは well に蓋をし、高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、よく混合します。
6. サンプルを軽く遠心し、すぐにプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに入れ、表 16 の通り設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します。

STEP2. 分子バーコードアダプターのライゲーション

1. サーマルサイクラが 4 °C Hold のステップになったら、サンプルを氷上に移します。
2. サーマルサイクラのプログラムを、表 18 の内容に設定します （蓋は加熱します)。プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、ステップ 5 まで蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 18　Ligation のサーマルプログラム*

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

* サーマルプログラムでの反応量は 100 μL に設定してください。

3. 末端修復・dA 付加反応済みの各 DNA サンプル （液量約 70 μL） に、Ligation Master Mix （p. 27 で調製済み、室温に保存） を 25 μL 加えます。85 μL に設定したピペットで少なくとも 10 回ピペッティングをするか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、混合します。その後、軽く遠心を行います。
4. Adaptor Oligo Mix （白い蓋のチューブ） を 5 μL、各サンプルに加えます。85 μL に設定したピペットで 15 ～ 20 回ピペッティングを行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、混合します。

NOTE Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix は必ずステップ 3 とステップ 4 で示したように、別々の工程でサンプルに加えてください。各ステップで加えた後は、必ず混合してください。

5. サンプルを軽く遠心し、すぐにプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに入れます。表 18 の通り設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します。

NOTE 分子バーコード配列は、このステップで各ライブラリ DNA 断片に組み込まれます。

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 4 °Cもしくは-20 °Cで一晩保存してください。

STEP3. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

このステップでは、AMPure XP ビーズを用いて DNA ライブラリを精製します。表 19 には経験豊富なユーザ向けとして精製プロトコルにかかる各種パラメータを記載しています。

表 19　アダプターライゲーション後の AMPure XP ビーズ精製パラメータ

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	80 µl
Final elution solvent and volume	35 µl nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 34.5 µl

1. 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きます （ビーズは通常は 4 °Cで保存し、決して凍らせないようにしてください)。
2. ステップ 8 で使用する 70 %エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL （と余剰分）を調製します。

NOTE

エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70 %エタノールは用時調製します。調製したエタノールは同じ日に実施する精製ステップで使用可能です。70 %エタノールは、ライブラリ調製 （ハイブリダイゼーション前まで） の工程トータルで、1 サンプルあたり 0.8 mL 必要です。

3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 80 µL を、前項で調製した DNA サンプル （液量約 100 µL） が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に注意して加えます。ピペッティングを 15 ～ 20 回程度行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. プレートもしくは 8 strip tube 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 5 ～ 10 分間かかります)。
7. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するとき、ビーズに触れないように注意します。
8. プレートもしくは 8 strip tube 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 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンダウン

し、サンプル中に残ったエタノールを集めます。プレートもしくは 8 strip tube を再度磁石スタンドにおき、キャップをはずして 30 秒静置します。ビーズを吸い込まないように注意しながら、20 μL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。

12. サンプルチューブを 37 °Cのサーマルサイクラにセットして、1 ～ 2 分程度 37 °Cで乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。

NOTE 本プロトコルに記載されているビーズの乾燥ステップでは、集積したビーズにひび割れが生じるまで乾燥させないようにしてください。ビーズを過度に乾燥させると、溶出効率が低下する危険性があります。

13. 35 μL の Nuclease-free water を加えます。
14. キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンダウンします。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. 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約 5 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。
17. 上澄み液 （液量約 34.5 μL） を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移し、氷上に置きます。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

NOTE このステップで、34.5 μL 全量を回収できない場合もありますが、可能な限り上澄み液を回収し、以降のステップに用います。17.25 μL にセットした 20 μL の容量のマイクロピペットで、2 回集めることで回収がしやすくなります。

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、表 20 に示す試薬を使用します。開始前に、表に記載されている試薬を溶かし、氷上に置きます。使用前に各試薬を指示通りに混合します。

表 20　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	page 35
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	page 35
100 mM dNTP Mix (green cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	page 35
Forward Primer (brown cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	page 35
SureSelect XT Low Input Index Primers	SureSelect XT Low Input Index Primers for ILM (Pre PCR),* –20°C	Vortexing	page 35

* インデックスプライマーは 96 ウェルプレートで 1 ～ 96 （黄色の Index Plate 1）、97 ～ 192 （赤色の Index Plate 2） のいずれかがキットに含まれています。

1. 各サンプルに割り当てるインデックスを決めます。このステップで DNA ライブラリの増幅に使用する SureSelect XT Low Input Index Primer の 8 bp のインデックス部分の配列については、「7. リファレンス」 の 表 44 を参照してください。
   同じレーンでシーケンスを行う各サンプルには、異なるインデックスプライマーを用いてください。

NOTE

異なる SureSelect キットで調製したライブラリをプールする場合、同じインデックス配列のライブラリを組み合わせないように注意してください。
例えば、SureSelect XT Low Input Reagent Kits （黄色のプレート） のインデックス 1 ～ 32 は、SureSelect XT HS Reagent Kits （黒色キャップのチューブ） のインデックス A01 ～ H04、Magnis SureSelect XT HS automation kits（黒色のインデックスストリップ）のインデックス A01 ～ 04 と同じ配列です。

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、各ウェルは 1 つのライブラリ調製反応に使用してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

2. サーマルサイクラのプログラムを、表 21 の内容に設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、ステップ 6 まで蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 21　キャプチャ前 PCR のサーマルプログラム*

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 22を参照してください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

* サーマルプログラムでの反応量は 50 μL に設定してください。

表 22　推奨のキャプチャ前 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 の値を基に決定した DNA 量

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 反応溶液 （ライブラリ DNA 以外の全ての試薬） の調製は、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 フード内にて陽圧の環境下で実施してください。

3. 表 23 の内容の試薬を混合して、適切な量のキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix を調製し、氷上に置きます。ボルテックスミキサでよく混合します。

表 23　キャプチャ前 PCR 反応 Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µl	90 µl	250 µl
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µl	4.5 µl	12.5 µl
Forward Primer (brown cap)	2 µl	18 µl	50 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	9 µl	25 µl
Total	**13.5 µl**	**121.5 µl**	**337.5 µl**

4. 表 23 の内容にて調製したキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix 13.5 µL を、PCR プレートもしくは 8 strip tube 中の各精製 DNA ライブラリサンプル （液量約 34.5 µL） に加えます。
5. 各反応液に、それぞれ適した SureSelect XT Low Input Index Primer を 2 µL 加えます。PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌します。その後、軽くスピンダウンし、液体を底に集め泡を除きます。
6. サンプルをサーマルサイクラに移す前に、表 21 のプログラムを開始し、ブロックの温度を 98 °Cにします。サーマルサイクラが 98 °Cに到達したら、すぐにサンプルの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに入れ、蓋を閉めます。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度が熱く、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 ビーズによる増幅ライブラリの精製

このステップでは、AMPure XP ビーズを用いて DNA ライブラリを精製します。表 24 には経験豊富なユーザ向けとして精製プロトコルにかかる各種パラメータを記載しています。

表 24　キャプチャ前 PCR 反応後の AMPure XP ビーズ精製パラメータ

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	50 µl
Final elution solvent and volume	15 µl nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 15 µl

1. 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きます （ビーズは通常は 4 °Cで保存し、決して凍らせないようにしてください)。
2. ステップ 8 で使用する 70 % エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL （と余剰分） を調製します。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 50 µL を、増幅反応液 （液量 50 µL） が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に注意して加えます。ピペッティングを 15 ～ 20 回程度行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. プレートもしくは 8 strip tube 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 5 分間かかります)。
7. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
8. プレートもしくは 8 strip tube 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 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンダウンし、サンプル中に残ったエタノールを集めます。プレートもしくは 8 strip tube を再度磁石スタンドにおき、キャップをはずして 30 秒静置します。ビーズを吸い込まないように注意しながら、20 µL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37 °Cのサーマルサイクラにセットして、1 ～ 2 分程度 37 °Cで乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。

NOTE 本プロトコルに記載されているビーズの乾燥ステップでは、集積したビーズにひび割れが生じるまで乾燥させないようにしてください。ビーズを過度に乾燥させると、溶出効率が低下する危険性があります。

13. 15 μL の Nuclease-free water を加えます。
14. キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンダウンします。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. 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約 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。
17. 上澄み液 （液量約 15 μL） を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移し、氷上に置きます。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

NOTE このステップで、15 μL 全量を回収できないこともありますが、可能な限り上澄み液を回収し、以降のステップに用います。

STEP6. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量

2100 Bioanalyzer もしくは TapeStation を用いてサンプルを確認します。

NOTE

どちらの方法でも、目的のライブラリ断片のピークだけではなく、低分子量のピークも確認される場合、ライブラリ中のアダプターダイマーの存在が考えられます。この後の工程であるターゲットエンリッチメントでは、ライブラリからアダプターダイマーを除去する必要ありません。しかし、全ゲノムシーケンス （サポートしているプロトコルは本プロトコルを含めご提供しておりません） の場合、アダプターダイマーを含むサンプルはさらに SPRI 精製を行なう必要があります。その場合、サンプルを Nuclease-free water で 50 μL に希釈し、p. 36「STEP5. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製」の内容にて SPRI 精製を行ってください。

オプション 1：2100 Bioanalyzer と DNA 1000 アッセイを使う場合

Bioanalyzer DNA チップと DNA1000 試薬キットを使用します。Agilent DNA 1000 Kit の操作説明書の内容に従って実施してください。

1. Agilent DNA 1000 Kit 操作説明書の内容に従い、2100 Bioanalyzer の装置をセットアップします。
2. Agilent DNA 1000 Kit 操作説明書の内容に従い、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、調製したチップを装置にセットし泳動を開始します。
3. 解析終了後、電気泳動図 （electropherogram） により、高品質の DNA の場合は 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 2 （高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 3 （中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 4 （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ます。p. 39 の図 2、図 3、図 4 と同じ程度に、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. 88 のトラブルシュートガイドを参照してください。
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にあることを確認してください。

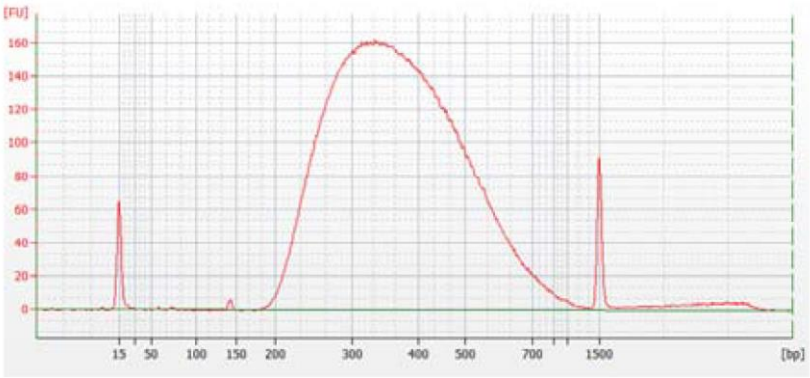


図 2　高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
（DNA 1000 アッセイ）

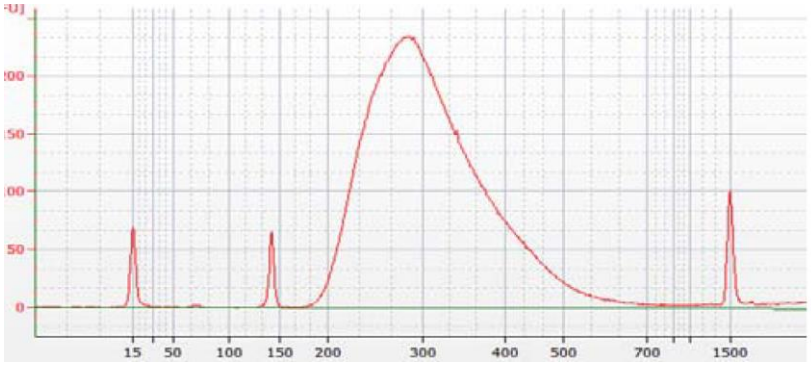


図 3　典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
（DNA 1000 アッセイ）

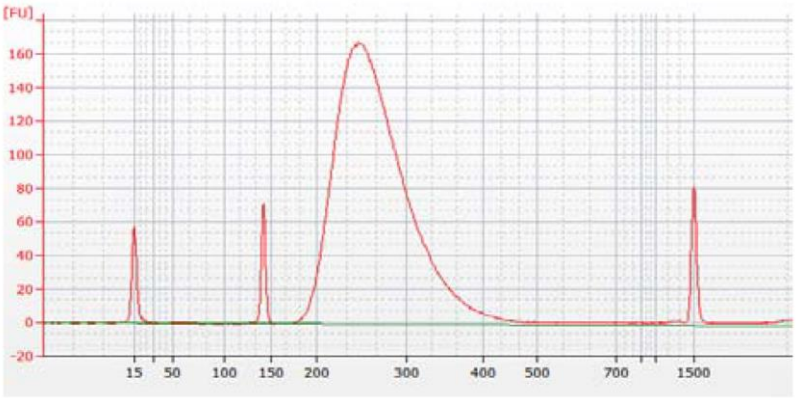


図 4　低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
（DNA 1000 アッセイ）

Stopping Point　次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 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。

オプション 2：TapeStation と D1000 ScreenTape を使う場合

D1000 ScreenTape と D1000 試薬キットを使用します。詳細は TapeStation の Agilent D1000 Assay の操作説明書を別途ご参照ください。

1. ユーザマニュアルの内容に従い、TapeStation のサンプルを調製します。
   各 DNA サンプル 1 μL を D1000 Sample Buffer 3 μL で希釈します。

CAUTION

正確な濃度測定のため、DNA とサンプルバッファを混合後、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分間混合してください。付属のボルテックスミキサをお持ちでない場合、Max speed で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全 Well を確実に混合してください。

2. ユーザマニュアルの内容に従い、ステップ 1 で調製した sample plate もしくは tube strip、D1000 ScreenTape、Loading tip チップを装置にセットし、泳動を開始します。
3. 解析終了後、電気泳動図 （electropherogram） により、高品質の DNA の場合は 300 ～ 400 bp、FFPE DNA の場合は約 20 ～ 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 5（高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 6 （中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 7 （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ます。p. 40 ～ 41 の図 5、図 6、図 7 と同じ程度に、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. 88 のトラブルシュートガイドを参照してください。
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。

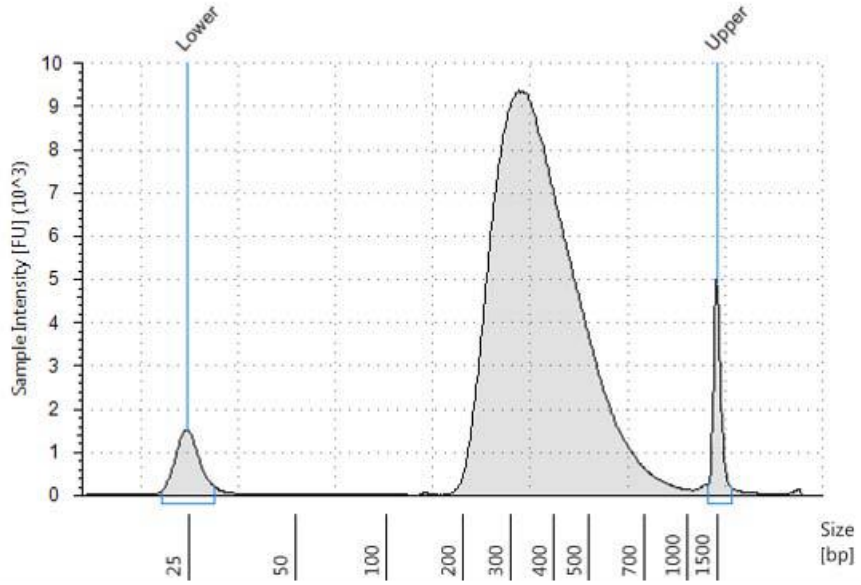


図 5　高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

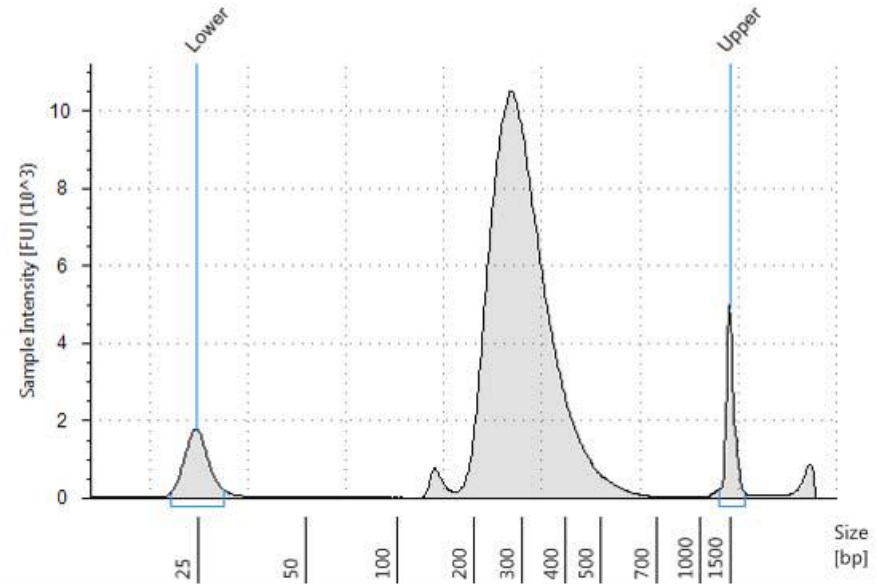


図 6　典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

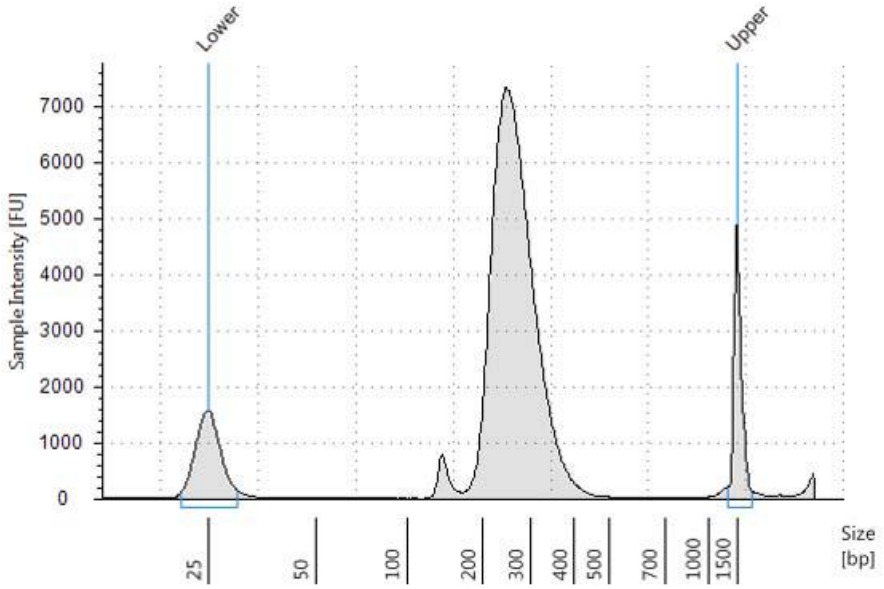


図 7　低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

Stopping Point　次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 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。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

STEP1. DNA サンプルのキャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション 43
STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製 48
STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 49

この章では、前章で調製した gDNA ライブラリとターゲット特異的なプローブでハイブリダイゼーションする工程を説明します。ハイブリダイゼーション後、ターゲットの DNA をストレプトアビジンビーズでキャプチャします。各 DNA サンプルはサンプルごとに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。

標準的な 1 日で操作するプロトコルは、約 90 分のハイブリダイゼーションステップ後すぐにキャプチャおよび増幅ステップに進みます。必要であればハイブリダイズサンプルは一晩おくことができ、その場合は p. 44 にある簡単なプロトコル変更を加えることでキャプチャおよび増幅を次の日に行うことが可能です。

CAUTION SureSelect キャプチャライブラリと gDNA ライブラリの比は、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 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、使用するチューブやプレート、キャップがサーマルサイクラに合っているかどうか確認してください。さらに使用するハイブリダイゼーションの条件で 4 μL 以上の溶液の蒸発がないか確認してください。

STEP1. DNA サンプルのキャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション

このステップでは、調製した gDNA ライブラリを SureSelect キャプチャライブラリとハイブリダイズします。各サンプルで、それぞれハイブリダイズとキャプチャを行います。この工程で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 gDNA ライブラリが 500 ～ 1000 ng 必要です（液量 12 μL）。この範囲内で、なるべく多くの量をハイブリダイゼーションに用いて下さい。

このステップでは表 25 の試薬を使用します。使用前に表に記載されているように各試薬を融解します。各試薬をボルテックスミキサで攪拌し、軽く遠心を行い、液を底に集めます。

表 25　ハイブリダイゼーションに使用する試薬

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	page 44
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	page 45
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	page 46
Capture Library	–80°C	Thaw on ice	page 46

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

1. サーマルサイクラのプログラムを、表 26 の内容に設定します （蓋は加熱します)。
   プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、ステップ 4 でサンプルを入れるまで、一時停止したままにします。

表 26　ハイブリダイゼーションのサーマルプログラム*

Segment #	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	1 minute (Pause cycler here for reagent addition; see step 7 on page 46)
4	60	65°C†	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C†	Hold briefly until ready to begin capture steps on page 49

* サーマルプログラムでの反応量は 30 μL に設定してください （Segment 4 のサイクルでの最終反応液量)。

† SureSelect XT HS2 / XT HS / XT Low Input プラットフォームに設計されたプローブは 65 °Cでのハイブリダイゼーションが最適です。ハイブリダイゼーションの温度 （Segment 4 と 5） を SureSelect XT Human All Exon V6 や SureSelect XT Clinical Research Exome V2 など SureSelect XT プラットフォームでは 62.5 °Cに、SureSelect XT システム用に設計されたカスタムプローブでは 60 ～ 65 °Cに下げることでパフォーマンスが向上する可能性があります。

NOTE

表 26 のサーマルプログラムは約 90 分かかります。ハイブリダイゼーションをオーバーナイトで行う場合は次のようにプロトコルを変更します。
・サーマルプログラム（表 26）の Segment 5 を 65 °C Hold から 21 °C Hold に変更します。
・ハイブリダイズしたサンプルは 21 °Cで 16 時間までおくことができます。
p. 49 のキャプチャステップを始める直前までに、p. 48 のストレプトアビジンビーズの準備を完了させてください。洗浄したストレプトアビジンビーズを各サンプルに添加する直前に、ハイブリダイズしたサンプルを室温に移動します。

2. 500 ～ 1000 ng の各 DNA ライブラリサンプルをハイブリダイゼーション用に準備した PCR プレートもしくは 8 strip tube に入れ、最終容量 12 μL になるように Nuclease-free water を加えます。各 DNA サンプルは 500 ～ 1000 ng の範囲内でなるべく多い量を使用してください。
3. 各 DNA ライブラリサンプルに、SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix （青いキャップ） を 5 μL 加えます。プレートもしくはチューブに蓋をし、高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌し混合します。軽くスピンダウンし液を底に集め泡を除きます。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度が熱く、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。

4. 蓋をしたプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに移し、p. 44 の表 26 の通り設定されたサーマルプログラムを開始します。

重要: p. 46 ステップ 7 のステップにて、ハイブリダイゼーションのサンプルチューブに追加で試薬を加えるため、サーマルサイクラを表 21 のように Segment 3 の間で Pause する必要があります。

Segment 1、2 の待ち時間に、p. 45 のステップ 5 およびステップ 6 の内容に示された試薬を調製しはじめます。必要に応じて、サーマルサイクラを Segment 3 で Pause した後にこれらの調製ステップを完了しても構いません。

5. 表 27 を参照し、SureSelect RNase Block 25 %溶液 （RNase Block 1 に対して Nuclease-free water 3） を調製します。ハイブリダイゼーション反応数 （＋余剰分） に応じて必要な量を調製してください。よく混合し、氷上に置きます。

表 27 RNase Block Solution の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
SureSelect RNase Block	0.5 µl	4.5 µl	12.5 µl
Nuclease-free water	1.5 µl	13.5 µl	37.5 µl
Total	**2 µl**	**18 µl**	**50 µl**

NOTE

サーマルサイクラを Segment 3 で Pause させる直前に、ステップ 6 での試薬を調製します。調製した試薬はステップ 7 で DNA サンプルに加えるまで室温に置く必要があり、その時間を極力短くするためです。キャプチャライブラリを含む溶液を長時間室温に置かないでください。

6. 使用するキャプチャライブラリのターゲットサイズに応じて、Probe Hybridization Mix を調製します。
   ターゲットサイズ 3 Mb 以上のキャプチャライブラリでは表 28、ターゲットサイズ 3 Mb 未満のキャプチャライブラリでは表 29 の内容に従ってください。
   表に記載されている溶液を室温で混合します。高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌しよく混合したあと、軽くスピンダウンします。すぐにステップ 7 に進みます。

表 28　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 Probe Hybridization Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 5)	2 µl	18 µl	50 µl
Capture Library ≥3 Mb	5 µl	45 µl	125 µl
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 µl	54 µl	150 µl
Total	**13 µl**	**117 µl**	**325 µl**

表 29　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 Probe Hybridization Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 5)	2 µl	18 µl	50 µl
Capture Library <3 Mb	2 µl	18 µl	50 µl
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 µl	54 µl	150 µl
Nuclease-free water	3 µl	27 µl	75 µl
Total	**13 µl**	**117 µl**	**325 µl**

7. サーマルプログラムの Segment 3 （表 26、65 °C 1 分間の反応） が始まったら、サーマルサイクラの Pause ボタンを押します。サーマルサイクラを Pause し、ステップ 6 で調製して室温に置いてある Capture Library Hybridization Mix 13 µL を、DNA と SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix の混合液にサーマルサイクラにセットした状態のままで加えます。ゆっくり 8 ～ 10 回ピペッティングしよく混合します。必要に応じてマルチピペットを使用してください。また、作業中はサーマルサイクラ中のサンプルを 65 °Cに保つようにしてください。
   この時点で、ハイブリダイゼーション反応液の液量は 30 µL になっています。
8. PCR プレートもしくは 8 strip tube を新しい strip cap で蓋をします （必ず新しいキャップを使用してください）。適切なキャッピングツールなどを用いて、全チューブ （well） を確実に密閉します。
   軽くボルテックスミキサをし、軽くプレートもしくは 8 strip tube を遠心しチューブ底の泡をのぞき、すぐにサーマルサイクラに戻します。

NOTE

再びキャップをするときには、常に新しい strip cap を使用してください。一度使用した strip cap 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。

9. サーマルサイクラのプログラムを再開し、DNA サンプルをプローブにハイブリさせます。

CAUTION

サンプルが入ったすべてのチューブが確実に密閉されている必要があります。チューブとキャップの間にわずかでも隙間があると液がハイブリ反応中に蒸発して、結果に悪い影響を与えます。
始めて実験を行う前に、使用するチューブやプレート、キャップがサーマルサイクラに合っているかどうかを確認し、さらに使用するハイブリダイゼーションの条件で 4 μL 以上の溶液が蒸発しないことを確認してください。

STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製

以降のハイブリダイゼーションキャプチャステップでは表 30 に示す試薬を使用します。

NOTE

ハイブリダイゼーションとキャプチャを同じ日に行う場合は、p. 46 ステップ 9 のハイブリダイゼーション反応を開始した約 1 時間後に、以降のビーズ調製を始めてください。21 °C Hold で一晩おきキャプチャを次の日に行う場合は、2 日目 p. 48 のキャプチャステップを始める直前に以降のビーズ調製を開始します。

表 30　キャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 48
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 49
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	page 49
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Follow storage recommendations provided by supplier (see 表 4 on Page 13)	page 48

1. ボルテックスミキサを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気ビーズをよく攪拌し再懸濁します。
2. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube を用意し、懸濁した磁気ビーズを 1 ハイブリダイゼーションサンプルあたり 50 µL、各チューブ （well） に入れます。
3. 下記手順に従いビーズを洗浄します。
   a. 200 µL の SureSelect Binding Buffer を加えます。
   b. 20 回ピペッティングするか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、ビーズを混合し、軽くスピンダウンします。
   c. ビーズの入ったプレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットします。
   d. 溶液が透明になるまで 5 分間以上静置し、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 ～ d の工程をさらに 2 回繰り返し、トータルで 3 回洗浄を行います。
4. ビーズを 200 µL の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。

NOTE

さらに大きな容量用の磁石スタンドを持っている場合は、本ステップを Eppendorf チューブやコニカルバイアルを用いて、まとめで磁気ビーズを洗浄することも可能です。

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

1. ハイブリダイゼーションのステップが完了し、サーマルサイクラが 65 °Cの Hold ステップ（p. 44 の Segment 5） に到達したら、サンプルをサーマルサイクラから外し、すぐにステップ 2 の作業をはじめます。
2. マルチチャンネルピペットを用いて、各ハイブリダイゼーションサンプルの全量 （約 30 μL） を、洗浄済み磁気ビーズ 200 μL の入ったチューブ （well） に移します。
   5 ～ 8 回ピペッティングして混合し、プレートもしくは 8 strip tube を新しい strip cap で蓋をします （必ず新しいキャップを使用してください）。
3. プレートもしくは 8 strip tube を 96 ウェルプレート用ミキサの上にセットし、1400 ～ 1800 rpm で攪拌しながら室温で 30 分間インキュベーションします。
   ビーズがチューブ中を動いて攪拌が行われていることを確認してください。
4. 30 分間のインキュベーション中に、以下の手順にて SureSelect Wash Buffer 2 を 70 °Cに温めます。
   a. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube を用意し、Wash Buffer 2 を 200 μL ずつ各チューブ （well） に入れます。 1 サンプルあたり 6 チューブ準備します。
   b. プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、70 °Cで保温したサーマルサイクラ （蓋を加熱） でステップ 9 まで保温しておきます。
5. ステップ 3 の 30 分間が終了したら、サンプルを軽くスピンダウンし液を底に集めます。
6. プレートもしくは strip tube を磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで静置し、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。
7. 磁気ビーズに 200 μL の SureSelect Wash Buffer 1 を加え、15 ～ 20 回ピペッティングを行い、完全にビーズを再懸濁します。
8. プレートもしくは 8 strip tube 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 1 分間かかります）。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。

CAUTION

キャプチャの特異性を確保するためには、以降の洗浄工程でビーズ懸濁液を 70 °Cに維持することが重要です。
SureSelect Wash Buffer 2 が事前に 70 °Cで温められていることを確認してください。
組織培養用のインキュベーターや、その他温度振れ幅の大きい装置は使用しないでください。

9. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、室温のチューブラックに移します。
   以下の手順に従い、ビーズを Wash Buffer 2 で洗浄します。
   a. 70 °Cで予め温めた Wash Buffer 2 を 200 μL、磁気ビーズに加え、15 ～ 20 回ピペッティングを行い、ビーズを完全に懸濁します。
   b. プレートもしくは 8 strip tube を新しい strip cap で蓋をします （必ず新しいキャップを使用してください）。高速のボルテックスミキサで 8 秒間攪拌し混合します。ビ

ーズが固まりにならない程度の軽い遠心でスピンダウンし、液を底に集めます。
以下の工程に進む前に、必ず液が懸濁されていることを確認します。

c. サンプルをサーマルサイクラで 70 °C、5 分間インキュベーションします （蓋は加熱）。
d. プレートもしくは 8 strip tube を室温で磁石スタンドにセットします。
e. 1 分間静置し、溶液が透明になるまで待ちます。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。
f. ステップ a ～ e をさらに 5 回繰り返します。トータルで洗浄を 6 回行います。

10. 全ての wash buffer が取り除かれていることを確認し、Nuclease-free water を 25 μL ずつ、各サンプルに加えます。ピペッティングを 8 回行い、ビーズを再懸濁します。
p. 54 ステップ 3 で使用するまで、サンプルを氷上に置きます。

NOTE キャプチャした 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　52
STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製　55
STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認　57
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　61
STEP5. シーケンスサンプルの調製　63
STEP6. シーケンスの開始とデータ解析　65

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説明します。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、SureSelect でエンリッチされた DNA ライブラリを PCR 増幅します。
このステップでは表 31 に示す試薬を使用します。表に記載されている各試薬を溶かし、氷上に置きます。

表 31 キャプチャ後 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 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), –20°C	Pipette up and down 15–20 times	page 53
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	page 53
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	page 53
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	page 53

DNA ライブラリ 1 種類に対して 1 増幅反応を実施してください。

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 滅菌灯を備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

1. サーマルサイクラのプログラムを、表 32 の内容に設定します （蓋は加熱します）。
   プログラムを開始後、Pause ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルを入れるまで、一時停止したままにします。

表 32 キャプチャ後 PCR 増幅サーマルプログラム

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のサイズに基づいたサイクル数の推奨については表 33 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

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

表 33 キャプチャ後 PCR サイクル数の推奨

Probe Size/Description	Cycles
Probes <0.2 Mb	14 cycles
Probes 0.2–3 Mb (includes ClearSeq Comp Cancer)	12 cycles
Probes 3–5 Mb	10 cycles
Probes >5 Mb (includes Human All Exon Probes)	9 cycles

2. 表 34 を参照に、適切な量のキャプチャ後 PCR 反応 Master Mix を調製し、氷上に置きます。
   ボルテックスミキサでよく混合します。

表 34 キャプチャ後 PCR 反応 Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	12.5 µl	112.5 µl	312.5 µl
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µl	90 µl	250 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	9 µl	25 µl
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µl	4.5 µl	12.5 µl
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 µl	9 µl	25 µl
Total	**25 µl**	**225 µl**	**625 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

3. 表 34 の内容にて調製したキャプチャ後 PCR 反応 Master Mix 25 μL を、ストレプトアビジンビーズに吸着したターゲットエンリッチ DNA （p. 50 で調製後、氷上に保存）が 25 μL 入った各サンプルチューブ （well） に加えます。
4. PCR 反応チューブ （well） を、ビーズが均一になるまでピペッティングでよく混合します。サンプルがチューブ （well） からあふれないようにしてください。このステップでチューブをスピンダウンしないでください。
5. PCR プレートもしくは 8 strip tube に新しい strip cap で蓋をします （必ず新しいキャップを使用してください)。サーマルサイクラにセットし、表 32 のサーマルサイクラのプログラムを開始します。
6. PCR 増幅反応が完了したら、PCR プレートもしくは 8 strip tube を軽くスピンダウンします。プレートもしくは 8 strip tube を室温で磁石スタンドにセットし、2 分間静置し、溶液が透明になるまで待ちます。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液 （液量約 50 μL） を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製

このステップでは、AMPure XP ビーズを用いて DNA ライブラリを精製します。表 35 には経験豊富なユーザ向けとして精製プロトコルにかかる各種パラメータを記載しています。

表 35　キャプチャ後 PCR 後の AMPure XP ビーズ精製パラメータ

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	50 µl
Final elution solvent and volume	25 µl nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 25 µl

1. 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（ビーズは通常は 4 °Cで保存し、決して凍らせないようにしてください）。
2. ステップ 8 で使用する 70 % エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL （と余剰分） を調製します。

NOTE　エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70 %エタノールは用時調製します。調製したエタノールは同じ日に実施する精製ステップで使用可能です。

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. PCR 増幅後の DNA サンプル （液量約 50 µL） が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 50 µL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 15 ～ 20 回程度行うか、もしくは well にキャップをして高速のボルテックスで 5 ～ 10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。ビーズが均一になるまで混合されていることを確認します。各サンプルチューブ （well） が、ビーズの層や透明な部分がない、色が均一な状態であることを確認してください。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。（約 3 ～ 5 分間かかります。）
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないようにします。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70 %エタノール溶液を各チューブに 200 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後、ビーズを吸い込まないように注意してエタノールを取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 のステップをもう一度繰り返します。トータルで 2 回洗浄を行ないます。各サンプルチューブ （well） のエタノールをなるべく全て取り除きます。

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

11. PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、軽くスピンダウンし残ったエタノールを底に集めます。ます。PCR プレートもしくは tube strip を磁石スタンドにセットし、30 秒静置します。20 μL の容量のピペットを用いて、残りのエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37 °Cのサーマルサイクラにセットして、1 ～ 2 分程度 37 °Cで乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。

NOTE 本プロトコルに記載されているビーズの乾燥ステップでは、集積したビーズにひび割れが生じるまで乾燥させないようにしてください。ビーズを過度に乾燥させると、溶出効率が低下する危険性があります。

13. 25 μL の Nuclease-free water を加えます。
14. PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンダウンし液を底に集めます。ビーズを沈殿させないよう注意します。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. 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約 2 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。
17. 上澄み液 （液量 約 25 μL） を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認

オプション 1：2100 Bioanalyzer と High Sensitivity DNA アッセイを使う場合

Bioanalyzer High Sensitivity DNA チップと試薬キットを使用します。Agilent High Sensitivity DNA Kit の操作説明書の内容に従って実施してください。

1. Agilent High Sensitivity DNA Kit 操作説明書の内容にて 2100 Bioanalyzer の装置をセットアップします。
2. Agilent High Sensitivity DNA Kit 操作説明書の内容に従い、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。
3. チップ調製後 5 分以内に、調製したチップを装置にセットし、泳動を開始します。
4. 解析終了後、電気泳動図（electropherogram）により、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 8（高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 9（中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 10（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にあることを確認してください。

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が不安定になる場合があります。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 μL に 1X TE を数 μL 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 μL とって測定することをお勧めします。希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

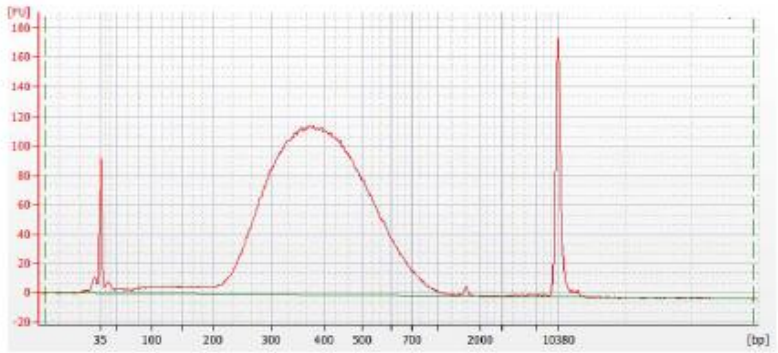


図 8　高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ　(High Sensitivity DNA assay)

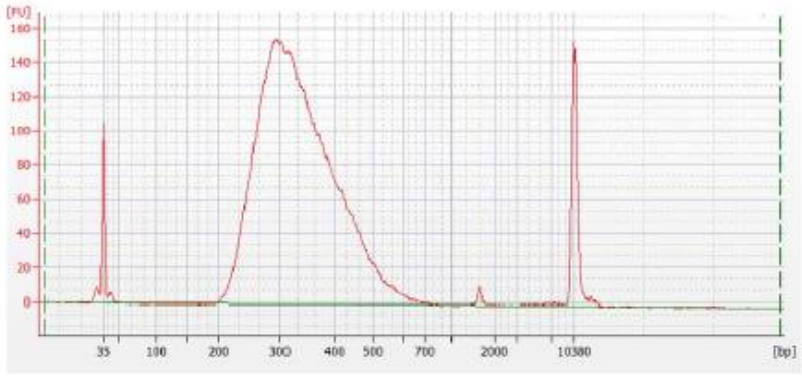


図 9 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ
(High Sensitivity DNA assay)

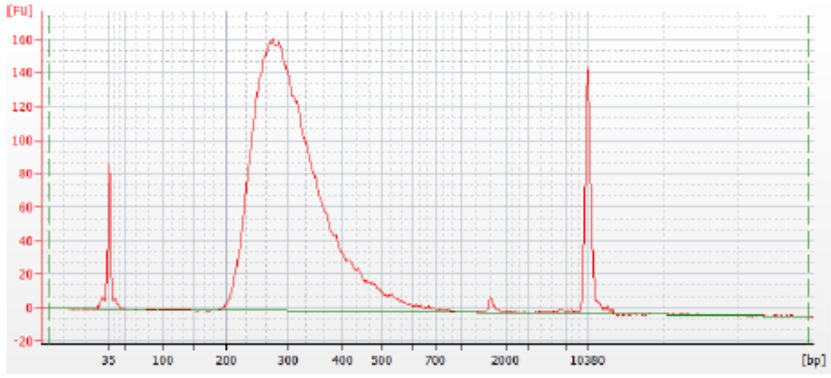


図 10 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ
(High Sensitivity DNA assay)

Stopping Point　次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 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。

オプション 2：TapeStation と High Sensitivity ScreenTape を使う場合

High Sensitivity D1000 ScreenTape と試薬キットを使用します。詳細は TapeStation の Agilent High Sensitivity D1000 Assay の操作説明書を別途ご参照ください。

1. ユーザマニュアルの内容に従い、TapeStation のサンプルを調製します。
   DNA サンプル 2 μL を High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2 μL で希釈します。

CAUTION

精密な濃度測定のため、DNA とサンプルバッファを混合後、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

2. ユーザマニュアルの内容に従い、ステップ 1 で調製した sample plate もしくは tube strip、High Sensitivity D1000 ScreenTape、Loading tip チップを装置にセットします。泳動を開始します。
3. 解析終了後、電気泳動図 （electropherogram） により、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 11 （高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 12 （中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 13 （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。
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。

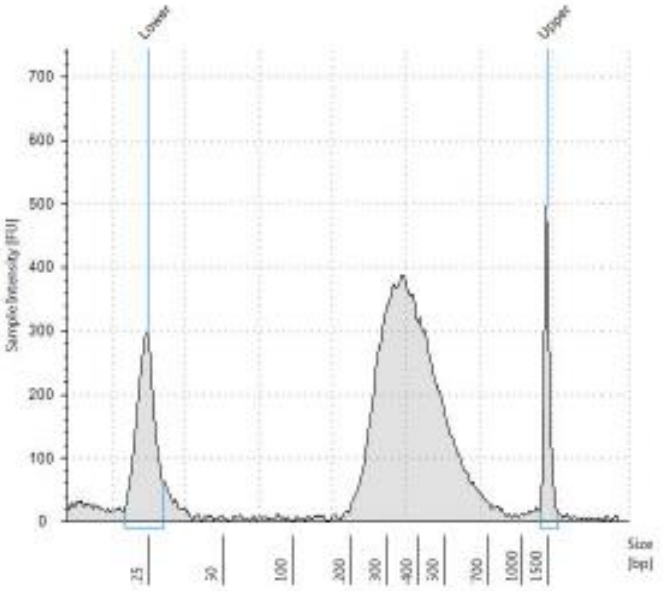


図 11 高品質 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ
（High Sensitivity D1000 ScreenTape assay による解析）

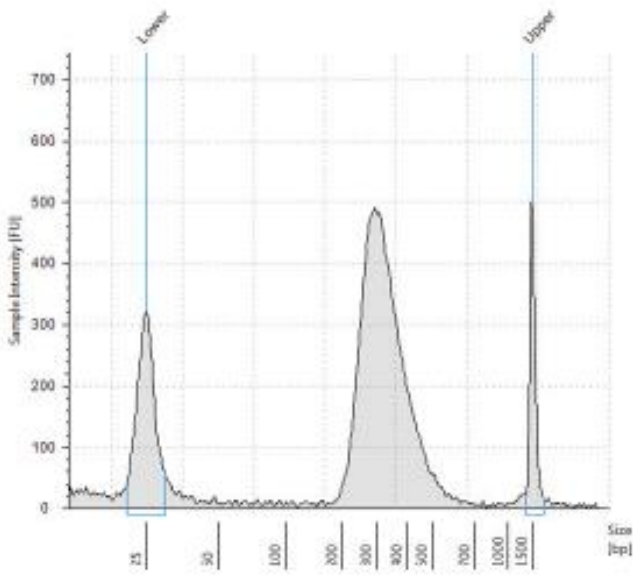


図 12 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ（High Sensitivity D1000 ScreenTape assay）

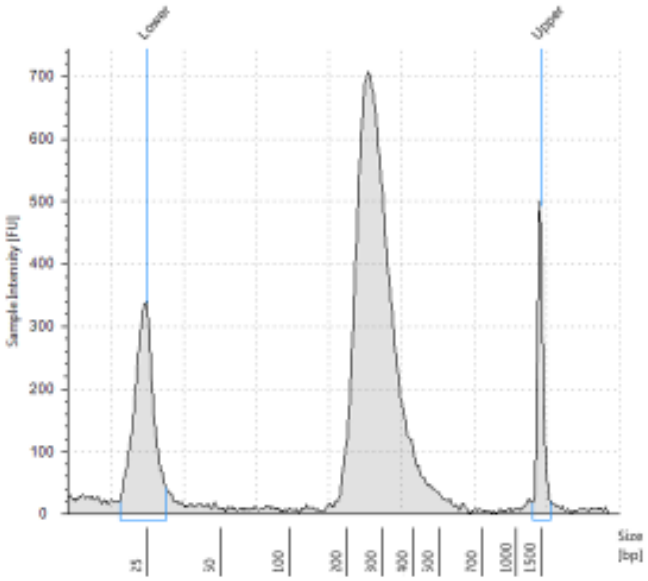


図 13 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ（High Sensitivity D1000 ScreenTape assay）

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 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。

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は、研究デザインで必要なシーケンス量と、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、必ずイル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 ～ 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 ～ 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 36 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 μL 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 36　10 nM の濃度でトータル 20 μL に調製する計算例

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

もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 を 0.1 % v/v になるように加え、-20 °Cで保存します。短期保存に限ります。

template の変性とフローセルの調製に進みます。イルミナ社のプロトコルを参照してください。

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、Illumina 社の標準的な Paired-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 14 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、Illumina 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。

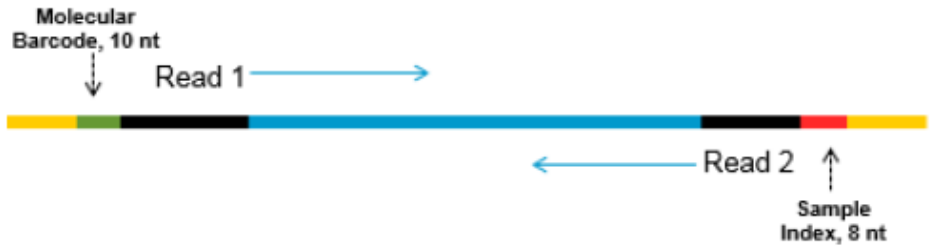


図 14　SureSelect XT Low Input シーケンスライブラリの構造
各断片は 1 つのターゲットインサート（青）はイルミナ paired-end シーケンスエレメンツ（黒）とサンプルインデックス（赤）、分子バーコード（緑）、ライブラリブリッジ PCR プライマ（黄）が付加されています。

ライブラリは Illumina 社 HiSeq、MiSeq、NextSeq、NovaSeq 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 37 をご覧ください。

CAUTION

解析のパイプラインに分子バーコード（i5）リードを含む場合は、HiSeq2500 の high-output ランモード（v4 chemistry）でシーケンスしないでください。SureSelect XT Low Input ライブラリを HiSeq2500 装置でこのモードでシーケンスすると、分子バーコードリードのシーケンスデータクオリティが低くなります（Q score が低くなり、coverage やバリアントコールの感度に影響します）。HiSeq2500 プラットフォームの別のランモード/chemistry の選択については表 37 をご覧ください。Read 1、Read 2、サンプルレベルインデックス（i7）リードには影響しませんので、分子バーコード解析を省略するアプリケーションではこの装置 / ランモード / chemistry の組み合わせを使用できます。

適した Illumina 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 37 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 37 を参照してください。シーディング濃度とクラスタ密度も、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。表 37 の内容に記載されている範囲の中間のシーディング濃度か

ら最適化を行ってください。

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 37　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	250 Cycle Kit	v4	12–14 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 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 or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	200–400 pM

* Translocation 検出も含む All-In-One assay の場合、Agilent はリード長 2x100 bp 以上、望ましくは 2x150 bp の条件でペアリードシーケンスを実施することを強く推奨します。

† 解析のパイプラインに分子バーコード （i5） リードを含む場合は、HiSeq 2500 の High-output ランモード （v4 chemistry） でシーケンスしないでください。この条件での HiSeq 2500 でシーケンスすると分子バーコードのシーケンスクオリティが下がり、シーケンスデータの Q score が下がります。Read 1、Read 2、サンプルレベルインデックス （i7） リードのシーケンス性能には影響はありません。

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. 86 の表 51 と p. 87 の表 52 を参照してください。

CAUTION

SureSelect XT Low Input Index Primer 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。

NOTE

分子バーコード （MBC） 解析が不要な場合は、このセクションのステップを変更し、i5 インデックスリードのシーケンスおよび解析を省略することができます。MBC の使用は、非常に低いアレル頻度のバリアントを検出する場合や、DNA サンプル量が限られた場合に推奨されます。

SureCall (v4.2) All-In-One Analysis ワークフローを用いて SureSelect Cancer All-In-One assay の解析を行う場合、このワークフローには MBC を用いた解析が含まれないことにご注意ください。

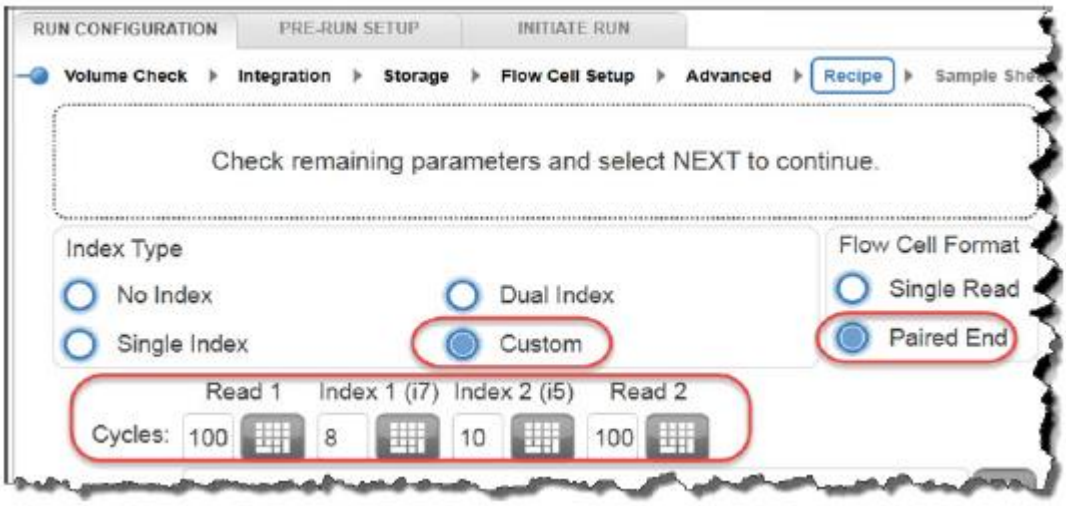
- HiSeq・NextSeq・NovaSeq プラットフォームでは、装置のユーザインターフェースからランのセットアップを行います。p. 67 のガイドラインに従ってください。
- MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM) を用いてランのセットアップを行います。p. 70 ～ 73 に記載されている手順に従い、カスタムサンプルシートを作成します。
- Illumina IEM adaptor trimming option は使用しないでください。シーケンスランをセットする際に IEM adaptor trimming option のチェックボックスが選択されていないことを確認します。アダプターは後述の Agilent 社のソフトウェアを用いてトリミングされ、アダプター配列内の分子バーコード （MBC） が適切に処理されるようにします。
- 適切な Illumina 社のソフトウェアでデマルチプレックスを行い、FASTQ フォーマットのペアエンドリードを作成します。MBC を使用しないワークフローの場合、イルミナの bcl2fastq、BCL Convert、または DRAGEN ソフトウェアを使用してデマルチプレックスすることができます。
  MBC を使用するワークフローの場合、Illumina の bcl2fastq ソフトウェアを使用して、以下の I2 MBC 検索ステップによってデマルチプレックスすることができます。
- 分子バーコード （i5） インデックスリードが含まれる I2 index ファイルを取得するには、別途.bcl から fastq ファイルへの変換が必要です。その方法については、HiSeq・NextSeq・

NovaSeq については p. 67、MiSeq については p. 70 をご覧ください。

- ヒト生殖細胞系列 DNA の変異解析には、Agilent Alissa Reporter software を使用して FASTQ ファイルから変異の検出までを行うことができます（p. 74 参照）。
- 生殖細胞または体細胞系列変異の解析には、Agilent AGeNT ソフトウェアを使用して FASTQ ファイルの処理から解析前の BAM ファイルの作成までを行うことができます（p. 76 参照）。

【HiSeq・NextSeq・NovaSeq 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・NovaSeq 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 の例に示されている Cycles の設定を参考に、Read Length の項目に入力してください。NextSeq・NovaSeq プラットフォームの Run Setup スクリーンの Custom Primers の項目では、全ての primer （Read 1, Read 2, Index 1, Index 2） のチェックボックスを外します （選択しないでください）。

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。

分子バーコードが含まれる I2 FASTQ ファイルの取得

分子バーコード （i5） インデックスリードが含まれる I2 index ファイルを取得するには、以下の 2 つの方法のいずれかにより、別途.bcl を.fastq に変換する必要があります。

オプション 1 ：bcl2fastq ソフトウェアで base masking とともに行う方法

Bcl2fastq ソフトウェアを用いて P5 分子バーコードを含む Index 2 fastq ファイルを作成するには、以下の変更を加え Illumina 社の操作説明書に従って実施してください。

1. Sample Sheet を使うことが必須です （オプションではありません）。Sample Sheet にサンプルインデックス （i7 / Index 1） の情報のみを追加します。分子バーコード（**I5_Index_ID** や **index2**） のカラム内容は削除します。
2. **Mask-short-adapter-reads** の数値を 0 にします。
3. Y*, I8, Y10, Y* のベースマスクを使用します （*は実際のリード長、RunInfo.xml ファイルのリード長と一致させる必要があります）。

CAUTION

Illumina 社の bcl2fastq ソフトウェアを用いて fastq ファイルを作成するとき、必ず上記に示したように Sample Sheet 中の **index2** カラムの内容を消去してください。**分子バーコードとして N_{10} の文字を入力するのではなく**、カラムのセルを空白にしてください。
Bcl2fastq ソフトウェアは、Sample Sheet の index 配列中の N の文字を wildcard として認識しないため、N を使用すると配列中の N 以外の文字とミスマッチを生じます。

オプション 2：Broad Institute Picard ツールを使用する方法

Broad Institute Picard ツールを用いて P5 分子バーコードを含む Index 2 fastq ファイルを作成するには、以下のステップに従ってください。

1. ExtractIlluminaBarcodes ツールを用いてバーコードを検索します。コマンドのサンプルセットを以下に示します（使用するコマンドとは設備ごとに異なることがあります）。

   nohup java -jar picard.jar ExtractIlluminaBarcodes
   BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/
   OUTPUT_DIR=<barcode_output_dir_name> LANE=1 READ_STRUCTURE=<read_structure>
   BARCODE_FILE=<barcode_file> METRICS_FILE=<metric_file_name>
   NUM_PROCESSORS=<n>

2. IlluminaBaseCallsToFastq ツールを用いて、ステップ 1 で出力された内容をもとに fastq ファイルを作成します。コマンドのサンプルセットを以下に示します（使用するコマンドとは設備ごとに異なることがあります）。

   nohup java -jar picard.jar IlluminaBasecallsToFastq
   BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/ LANE=1
   BARCODES_DIR=<barcode_output_dir_name> READ_STRUCTURE=<read_structure>
   FLOWCELL_BARCODE=<FCID> MACHINE_NAME=<machine_name>
   RUN_BARCODE=<run_number> ADAPTERS_TO_CHECK=PAIRED_END
   NUM_PROCESSORS=<n> READ_NAME_FORMAT=CASAVA_1_8 COMPRESS_OUTPUTS=true
   MULTIPLEX_PARAMS=<multiplex_params_file> IGNORE_UNEXPECTED_BARCODES=true
   TMP_DIR=<temp_directory_location>

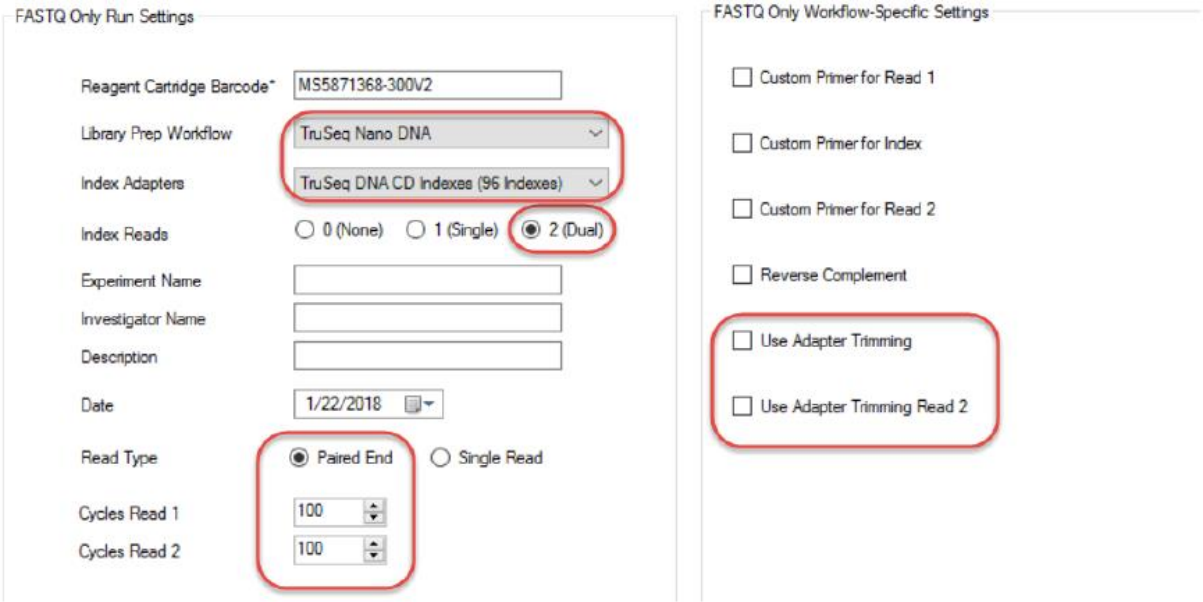
【MiSeq プラットフォームによるシーケンスのランセットアップガイドライン】

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. 86 の表 51 と p. 87 の表 52 を参照してください。
分子バーコードを使用しないワークフローの場合、このセクションの手順を変更し Single Index Read (i7)を収集し、I2 MBC ファイル取得の手順を省略します。

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。
   Library Prep Workflow の項目は、TruSeq Nano DNA を選択します。Index Adapters の項目は TruSeq DNA CD Indexes （96 Indexes） を選択します。FASTQ Only Workflow-Specific Setting の adaptor-trimming チェックボックスがデフォルトでは選択されているため、両方 （下図赤で囲んだ部分） を外します。
   もし TruSeq Nano DNA が Sample Prep Kit の項目にない場合は、代わりに TruSeq HT を選択します。



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 ファイルを保存します。

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、カラム 6 ～ 9 の i7、i5 のインデックス情報を変更します （図 15：黄色くハイライトされた部分）。
   - 6 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。7 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 のインデックスの塩基配列については、p. 86 の表 51 と p. 87 の表 52 をご覧ください。
   - 8 番目の I5_Index_ID のカラムには、すべてのサンプルに対して「MBC」と入力します。9 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。

NOTE

Sample sheet を MiSeq Reporter ソフトウェアで使用して分子バーコードを含む I2 fastq ファイルを作成するときのみ （p. 68 参照）、index2 カラムに N_{10} の文字を入力してください。イルミナ社の bcl2fastq ソフトウェアで sample sheet を用いる場合は N_{10} の wildcard インデックス配列を含めないでください（詳細は p. 68 参照）。

[Header]									
IEMFileVer	5								
Experimen	XTHS								
Date	1/22/2018								
Workflow	GenerateFASTQ								
Applicatio	FASTQ Only								
Instrumen	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index Ada	TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)								
Description									
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
100									
100									
[Settings]									
ReverseCo	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_W	Index_Plate_W	I7_Index_ID	index	I5_Index_I	index2	Sampl
XTHS-S1	XTHS-S1	1	A01	A01	A01	GTCTGTCA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS
XTHS-S2	XTHS-S2	1	B01	B01	B01	TGAAGAGA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS

図 15　MiSeq Reporter 用に変更を加えた後の MiSeq プラットフォームの Sample sheet

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。

I2 FASTQ ファイルを取得するための MiSeq Reporter ソフトウェアの設定の変更

デフォルトでは MiSeq Reporter ソフトウェアは Index リードの fastq ファイルを出力する設定になっておりません。MiSeq Reporter を用いて分子バーコードを含む fastq I2 index ファイルを作成するには、最初に MiSeq で SureSelect XT Low Input ライブラリのシーケンスを行う前に、ソフトウェアの設定を以下の内容の通り変更してください。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

SureSelect XT Low Input ライブラリのシーケンス以外に同じ装置を用いている場合は、configuration file は<add key=”CreateFastqForIndexReads” value=”0”/>と変更する必要があり、また他のシーケンスを行う前には再起動する必要があります。

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でない装置の場合、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。

p. 68 の HiSeq と NextSeq プラットフォームのための I2 fastq ファイルの取得の方法は、MiSeq プラットフォームにも使用できます。

【データ解析リソース】

以下のガイドラインは、SureSelect XT Low Input DNA ライブラリのデータ解析に適した典型的な NGS 解析パイプラインステップです。お使いの NGS 解析パイプラインによって異なります。SureSelect Cancer All- In- One アッセイについてのシーケンス解析のガイドラインは、製品ページをご覧ください。

Illumina 社の適切なソフトウェアを用いて、デマルチプレックスを行い、ペアエンドリードを作成します（p. 65 のガイドライン参照）。デマルチプレックスされた FASTQ データは、アダプター配列の除去および i5 MBC （利用している場合） 配列抽出のため、後述のツールのいずれかを使用して、前処理を行う必要があります。

生殖細胞系列 DNA ワークフローで Agilent Alissa Reporter ソフトウェアを使用する場合

Alissa Reporter ソフトウェアは SureSelect 解析において FASTQ からフォーマットから VCF フォーマットへのデータの処理と、ヒト生殖細胞系列の SNV、InDel、CNV の検出のレポートまでのソリューションを提供します。

Alissa Reporter はクラウドベースのマルチテナントのサービスとしてのソフトウェア （SaaS）製品で、SureSelect XT Low Input DNA ライブラリリードの前処理 （アダプタートリミング、MBC 抽出、デデュプリケーション） から 2 次データ解析、QC 解析までをビルトインのダッシュボード中で行うことができます。詳細については www.agilent.com の Alissa Reporter 製品ページを参照ください。

SureSelect XT Low Input DNA アッセイで Alissa Reporter ソフトウェアを使用する前に考慮すべき重要な事柄については、以下の要約を参照ください。

- Alissa Reporter アプリケーションはプレデザインあるいはカスタムの SureSelect human probe を用いて濃縮されたヒト DNA ライブラリの生殖細胞系列の変異解析に使用できます （p. 12）。SureSelect XT HS Human All Exon V7 または V8 プローブを用いてエンリッチしたライブラリは、Alissa Reporter 中の対応する *Human All Exon V7 Germline* または *Human All Exon V8 Germline* アプリケーションを利用して解析します。その他のプローブ（プレデザインプローブを含む） を用いて濃縮されたライブラリは、Alissa Reporter のカスタムアプリケーションを利用して解析します。Alissa Reporter コンソールからは、プレデザインのプローブとカスタムプローブの両方を SureDesign からインポートし、新しいカスタムアプリケーションをセットアップするためのツールが提供されています。

NOTE

Human All Exon V8+UTR と Human All Exon V8+NCV デザインは、Alissa Reporter 内のカスタムタイプのアプリケーションを利用してインポートする必要があります。Human All Exon V8 Germline アプリケーションを含むカタログタイプのアプリケーションは特定のデザインのみに対応しており、その他のデザインには対応しておりません。

- 体細胞変異検出のための FFPE 由来あるいはその他の DNA サンプルの解析には現時点で対応しておりません。Alissa Reporter ソフトウェアの最新バージョンの機能については www.agilent.com の Alissa Reporter 製品ページを参照してください。
- CNV コールには、同一 Alissa Reporter ランからの無関係なサンプルを使用して、ターゲットサンプルのレファレンスシグナルを決定する共同分析ストラテジーが使用されます（特定のレファレンスサンプルは必要ありません）。CNV コールのための信頼できるレファレンスシグナルを得るためには、少なくとも 3 つ、好ましくは 8 つ（またはそれ以上）の無関係なサンプルが一緒に Alissa Reporter で分析される必要があります。X 染色体および Y 染色体上の CNV コールには、同性の無関係なサンプルが必要です。最良の結果を得るためには、処理に基づくばらつきを最小限に抑えるため、CNV 共同解析に使用するサンプルは、同じ SureSelect ランおよび同じシーケンスランで CNV 共同解析に使用するサンプルを処理してください。
- アップロード可能なファイルサイズは最大 50 GB / ファイル（合計 400 GB / サンプル）です。また、アップロード可能な FASTQ ファイル数は最大 768 個です。
- Human All Exon V7 Germline または Human All Exon V8 Germline アプリケーションを使用するとき、ファイルサイズが 150 M を超える場合には、ランダムに 150 M リードにサブサンプリングされます。
- 未マージおよびマージ済の FASTQ ファイルに対応しています。BAM ファイルやその他の FASTQ 以外のファイル形式のアップロードには対応していません。

生殖細胞または体細胞系 DNA ワークフローで Agilent AGeNT ソフトウェアを使用する場合

Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) は SureSelect XT Low Input DNA ライブラリのリード処理ステップに使用できる Java ベースのソフトウェアモジュールです。この toolkit は、バイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、インターナルな解析パイプラインの構築、統合、メンテナンスおよびトラブルシュートができるようにデザインされています。詳細な情報や toolkit のダウンロードは www.agilent.com の AGeNT 製品ページおよび AGeNT Best Practices をご覧ください。

バリアント探索の前に、AGeNT Trimmer モジュールを使用して、デマルチプレックスされた SureSelect XT Low Input ライブラリの FASTQ データを前処理し、シーケンスアダプターをトリミングして、アライメント済み BAM ファイルに挿入する MBC リードを準備します。

トリミングしたリードはアラインされ、BWA-MEM のような適切なツールでアラインした BAM ファイルに MBC タグを付加します。アライメントとタグ付けが完了すると、AGeNT の CReaK (Consensus Read Kit) モジュールを用いてコンセンサスリードの生成やデュプリケートのマーク付けまたは除去します。BAM ファイルは、バリアント探索を含む下流の解析に使用できます。

NOTE

ReaK は AGeNT version 3.0 内のデデュプリケーションツールであり、従来の AGeNT LocatIt の代替として含まれています。LocatIt と CReaK の違いについての詳細は www.agilent.com の Agent 製品ページの FAQ を参照してください。LocatIt は引き続き使用可能ですが、CReaK の使用を推奨しています。

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 78
FFPE サンプルの品質確認 78
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨 79

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 38 に示します。

表 38　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 page 17	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
DNA input for Library Preparation page 17	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity （p. 18 の表 8 と p. 19 の表 9 を参照してください。）
DNA Shearing page 20	Mode of DNA Shearing	2 × 120 seconds	240 seconds (continuous)
Enzymatic Fragmentation of DNA page 23	Duration of 37°C incubation	2 ×100 reads: 15 minutes 2 ×150 reads: 10 minutes	2 ×100 reads: 15 minutes 2 ×150 reads: 15 minutes
Pre-capture PCR page 34	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing page 79	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity （p. 79 の表 39 と表 40 を参照してください。）

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 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 ΔΔCq 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 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 サンプルを用いて、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、以下のガイドラインを参考にして FFPE DNA サンプルで必要な追加シーケンスアウトプット量を決定してください。

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 39 のガイドラインを参照してください。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 39　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 40 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 40　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

キット内容　81
SureSelect XT Low Input インデックスの塩基配列　86
トラブルシュートガイド　88
クイックリファレンス　92

この章では、キットに含まれている試薬、インデックス配列、トラブルシュート情報、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しています。

キット内容

SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit は、SureSelect XT Low Input Reagent Kits を用いたライブラリ調製前の DNA サンプル断片化に使用することができ、表 41 に示す試薬が含まれています。

表 41　SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit （-20 °C保存）

Kit Component	16 Reactions (p/n 5191-4079)	96 Reactions (5191-4080)
SureSelect Fragmentation Enzyme	tube with green cap	tube with green cap
5× SureSelect Fragmentation Buffer	tube with blue cap	tube with blue cap

SureSelect XT Low Input Reagent Kits には、表 42 または表 43 に記載された内容が含まれます。

表 42　SureSelect XT Low Input Reagents Index 1-96 [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 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 43　SureSelect XT Low Input Reagents Index 97-192 [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 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

各キットには、表 44 ～ 表 47 に記載された内容が含まれます。

表 44　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 45　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)†

* インデックス配置は p. 85 の表 49 を、インデックス配列については、p. 86 の表 51 をご覧ください。

† インデックス配置は p. 85 の表 50 を、インデックス配列については、p. 87 の表 52 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、各ウェルは 1 つのライブラリ調製反応に使用してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

表 46　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 47　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

特定のターゲットエンリッチメント用プローブを含む SureSelect XT Low Input Reagent Kit のバンドル製品は、表 48 のカタログ番号を使って購入ができます。これらのバンドル製品には、p. 81 の表 42 または表 43 に示されるキットが付属しています。

表 48　対応する SureSelect XT Low Input Reagent Kit と Probe

Included SureSelect (SSel) XT Low Input Probe	Included SureSelect XT Low Input Reagent Kit	
	96 Reactions, with Index Primers 1–96	96 Reactions, with Index Primers 97–192
Custom 1–499 kb*	G9707A	G9708A
Custom 0.5 –2.9 Mb*	G9707B	G9708B
Custom 3–5.9 Mb*	G9707C	G9708C
Custom 6–11.9 Mb*	G9707D	G9708D
Custom 12–24 Mb*	G9707E	G9708E
ClearSeq Comp Cancer	G9707G	G9708G
Clinical Research Exome V2	G9707H	G9708H
Clinical Research Exome V2 Plus	G9707J	G9708J
Human All Exon V6	G9707K	G9708K
Human All Exon V6 Plus	G9707L	G9708L
Human All Exon V6+UTRs	G9707M	G9708M
Human All Exon V7	G9707N	G9708N
Human All Exon V7 Plus 1	G9707P	G9708P
Human All Exon V7 Plus 2	G9707Q	G9708Q
Cancer All-In-One Lung	G9707R	G9708R
Cancer All-In-One Solid Tumor	G9707S	G9708S

* アジレントの SureDesign で設計されたカスタム SureSelect Cancer All-In-One パネルを含むキットは、これらのカスタムデザインの型番を使用して注文します。カスタムパネルは、'A'で始まるデザイン ID で指定されます(デザイン ID は、プローブバイアルラベルおよび関連する分析証明書(CoA)を参照してください)。

表 49　SureSelect XT Low Input Index Primer 1-96 （黄色いプレート、Index Plate 1）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 50　SureSelect XT Low Input Index Primer 97-192 （赤いプレート、Index Plate 2）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. 65 を参照してください。

表 51　SureSelect XT Low Input インデックス 1-96 （黄色い 96 ウェルプレート）(Index Plate 1)

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	GACTAGTA	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	GGAGAACA	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 52　SureSelect XT Low Input インデックス 97-192 （赤い 96 ウェルプレート）(Index Plate 2)

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	D10	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	TAGTGTTC	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	CCTGTAAT
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

トラブルシュートガイド

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ときがあります。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ッティングしながら、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。

FFPE DNA サンプルの濃度が低く、酵素による断片化が困難な場合

✓ 標準的な酵素断片化プロトコルは、10 ～ 200 ng の input DNA を 7 µL 必要とし、断片化反応の最終量は 10 µL となります。濃度が低い FFPE サンプルの場合、以下のプロトコルを用いて酵素切断を行うことができます。

- 10 ～ 200 ng の DNA を含む FFPE サンプルを、1X Low TE Buffer で最終量 17 µL に調製します。
- Fragmentation Master Mix を表 13 （p. 24） に従って調製します。
- 17 µL の各 DNA サンプルに Fragmentation Master Mix を 3 µL ずつ加えます。p. 24 の指示通りに混合し、スピンダウンします。
- 表 11 （p. 23） の通り、サーマルプログラムを実行します。

NGS read length	High-quality DNA samples	FFPE DNA samples
2 ×100 reads	25 minutes	25 minutes
2 ×150 reads	15 minutes	25 minutes

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・ピペッティング・混合の特異的な説明が記載されております。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。

✓ Ligation Master Mix は、使用する前、必ず 30 ～ 45 分間室温に置いてください（p. 27 参照)。

- ✓ 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。
- ✓ SPRI 精製ステップでの DNA の溶出が不完全である可能性があります。サンプル溶出の前の AMPure XP ビーズを過剰に乾燥させないでください。

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と異なる

- ✓ 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. 36 のキャプチャ前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。

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. 39 ～ 41 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。アダプターダイマーが多く存在する場合は、アダプターライゲーションの工程が p. 30 に記載されている内容で実施されているかどうか確認してください。特に、Ligation Master Mix をサンプルと混合してから、その後 Adaptor Oligo Mix を混合する点に注意してください。Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix を同時にサンプルに入れてはいけません。

✓ 全ゲノムシーケンス（本プロトコルを含めサポート外）で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、p. 36 に記載されている SPRI 精製操作を行ってください。

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。

✓ 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。Capture Library Hybridization Mix solution は、p. 46 の内容にて、使用する直前に調製してください。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と異なる

✓ 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. 55 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後の洗浄の stringency が想定より低いことが考えられます。洗浄操作は記載されているとおりに実施してください。その際特に、SureSelect Wash Buffer 2 による洗浄における下記に示した点にご留意ください。

- SureSelect Wash Buffer 2 が 70 °Cに予め温められていること （p. 49 参照）
  0.2 mL 容量を効率よく加熱ができるようなブロックを備えたサーマルサイクラを使用してください。Wash Buffer の入ったプラスチックウェアがサーマルサイクラのブロック内の well に完全に収まり、温めている間にブロック中に見える液量が最小限であることを確認してください。
- 洗浄中はサンプルが 70 °Cで保たれていること （p. 50 参照）

・ 洗浄中は、ピペッティングとボルテックスミキサでビーズが均一な状態に混合されていること （p. 50 参照）

✓ ハイブリダイゼーションの際、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. 46 のステップ 8 と 9） 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ダ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. 44 の表 26 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。

クイックリファレンス

略語を用いたプロトコルステップのまとめを以下に示しました。チェックリストとして等、適宜ご利用ください。試薬の混合内容や装置設定など、プロトコル全工程の詳細に慣れるまでは p. 17 ～ 73 を必ずご覧ください。

Step	Summary of Conditions
	Library Prep
Prepare, qualify, and fragment DNA samples	Prepare 10–200 ng gDNA (in 50 µl Low TE for Covaris or in 7 µl H_20 for enzymatic fragmentation) For FFPE DNA, qualify integrity and adjust input amount as directed on page 18 and page 19 Mechanically shear DNA using Covaris with shearing conditions on page 21 OR fragment DNA using SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit with protocol on page 23 (50 µl final volume)
Prepare Ligation master mix	Per reaction: 23 µl Ligation Buffer + 2 µl T4 DNA Ligase Keep at room temperature 30–45 min before use
Prepare End-Repair/dA-Tailing master mix	Per reaction: 16 µl End Repair-A Tailing Buffer + 4 µl End Repair-A Tailing Enzyme Mix Keep on ice
End-Repair and dA-Tail the sheared DNA	50 µl fragmented DNA sample + 20 µl End Repair/dA-Tailing master mix Incubate in thermal cycler: 15 min @ 20°C, 15 min @ 72°C, Hold @ 4°C
Ligate adaptor	70 µl DNA sample + 25 µl Ligation master mix +5 µl Adaptor Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 30 min @ 20°C, Hold @ 4°C
Purify DNA	100 µl DNA sample + 80 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 35 µl nuclease-free H_2O
Prepare PCR master mix	Per reaction: 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer + 0.5 µl 100 mM dNTP Mix + 2 µl Forward Primer + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the purified DNA	34.5 µl purified DNA + 13.5 µl PCR master mix + 2 µl assigned SureSelect XT Low Input Index Primer Amplify in thermal cycler using program on page 34
Purify amplified DNA	50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 15 µl nuclease-free H_2O
Quantify and qualify DNA	Analyze 1 µl using Agilent 2100 Bioanalyzer or 4200/4150 TapeStation instrument

Step	Summary of Conditions
	Hybridization/Capture
Program thermal cycler	Input thermal cycler program on page 44 and pause program
Prep DNA in hyb plate	Adjust 500–1000 ng purified prepared library to 12 µl volume with nuclease-free H_2O
Run pre-hybridization blocking protocol	12 µl library DNA + 5 µl SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix Run paused thermal cycler program segments 1 through 3; start new pause during segment 3 (1 min @ 65°C)
Prepare Probe Hyb Mix	Prepare 25% RNAse Block dilution, then prepare appropriate mixture below: **Probes ≥3 Mb:** 2 µl 25% RNase Block + 5 µl Probe + 6 µl SureSelect Fast Hybridization Buffer **Probes <3 Mb:** 2 µl 25% RNase Block + 2 µl Probe + 3 µl nuclease-free H_2O + 6 µl SureSelect Fast Hybridization Buffer
Run the hybridization	With cycler paused and samples retained in cycler, add 13 µl Probe Hyb Mix to wells Resume the thermal cycler program, completing segments 4 (hybridization) and 5 (65°C or 21°C hold)
Prepare streptavidin beads	Wash 50 µl Dynabeads MyOne Streptavidin T1 beads 3× in 200 µl SureSelect Binding Buffer
Capture hybridized libraries	Add hybridized samples (~30 µl) to washed streptavidin beads (200 µl) Incubate 30 min at RT with vigorous shaking (1400-1800 rpm) During incubation, pre-warm 6 × 200 µl aliquots per sample of SureSelect Wash Buffer 2 to 70°C
Wash captured libraries	Collect streptavidin beads with magnetic stand, discard supernatant Wash beads 1× with 200 µl SureSelect Wash Buffer 1 at RT Wash beads 6× with 200 µl pre-warmed SureSelect Wash Buffer 2 (5 minutes at 70°C per wash) Resuspend washed beads in 25 µl nuclease-free H_2O
	Post-capture amplification
Prepare PCR master mix	Per reaction: 12.5 µl nuclease-free H_2O+ 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer + 0.5 µl 100 mM dNTP Mix + 1 µl SureSelect Post-Capture Primer Mix + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the bead-bound captured libraries	25 µl DNA bead suspension+ 25 µl PCR master mix Amplify in thermal cycler using conditions on page 53
Purify amplified DNA	Remove streptavidin beads using magnetic stand; retain supernatant 50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 25 µl nuclease-free H_2O
Quantify and qualify DNA	Analyze 1 µl using Agilent 2100 Bioanalyzer or 4200/4150 TapeStation instrument

©Copyright Agilent Technologies 2023

G230561

SureSelect 製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120 - 477 - 111

Mail: email_japan@agilent.com

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く

9：00 ～ 12：00、13：00 ～ 17：00

※ SureSelect のプロトコル名とともに、テクニカルな質問と明示してください。

※ 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。