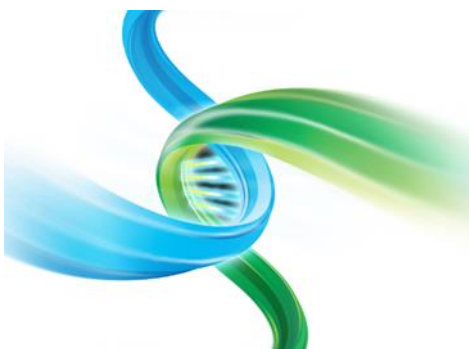
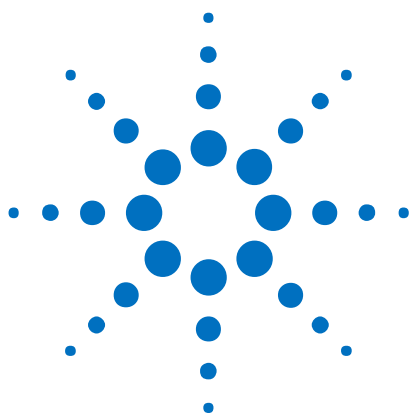




アジレント
SureSelect XT HS2
ターゲットエンリッチメント
システム
プレプール方式

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 D0 対応

[2021 年 12 月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した
SureSelect プラットフォーム

掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021

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. 6,627,424 および EP Pat. No.1 283 875 81 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。

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 HS2 DNA System with Pre-Capture Pooling DNA Library Preparation, Pre-Capture Pooling and Target Enrichment for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Version D0, April 2021 [G9985-90000] に対応しています。

このプロトコルでは、プレキャプチャプール方式のアジレント SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits 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、複数サンプルをプールした後にゲノムの中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ターゲット領域をキャプチャする前に、分子バーコードが付加されたインデックスライブラリを調製し、サンプルをプールします。

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 HS2 DNA Reagent Kit およびプレキャプチャプールに対応したプローブライブラリを使用して、プレキャプチャプールされた NGS 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ステップを説明しています。

3. ライブラリ調製

この章では、ターゲットエンリッチメントする前の、デュアル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 ライブラリをプールし、SureSelect や ClearSeq オリゴキャプチャライブラリで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を調製する工程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成分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。

D0 までの変更点

- ・ 通知、保証などを和文プロトコルに記載しました。
- ・ SureSelect XT HS Human All Exon V8 のリリースに伴い、必要なもののリスト（表 2）やプレキャプチャプールの推奨（表 26）、ハイブリダイゼーションプログラム（表 28）、トラブルシューティングガイド、クイックリファレンスなどを更新しました。
- ・ ハイブリダイゼーションとキャプチャの章を、2 つのサマールプロファイル（表 28 と表 29）を含む内容に更新しました。
- ・ DNA やライブラリの解析プラットフォームに Fragment Analyzer を追加し（表 5、表 24 および表 38）、ライブラリ評価のガイドラインを更新しました。
- ・ Dynabeads、Qubit などの型番を更新しました。
- ・ FFPE 由来 DNA の断片化処理について補足説明を追加しました（表 10 および表 13）。
- ・ イルミナ社のキット選択ガイドラインを更新しました（表 41）。
- ・ シーケンスプラットフォームによる P5 の配列方向について説明を追記し、配列リストを更新しました（表 51～表 58）。

内容

1. はじめに	7
ワークフロー概要	8
操作に関する注意	9
安全に関する注意	9
実験に必要な試薬	10
2. インプット DNA の準備と断片化	14
Step 1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認	15
Fresh なサンプル由来の質の高い gDNA の場合	15
FFPE サンプル由来の gDNA の調製と品質確認	15
Step 2. DNA の断片化	17
方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化	17
方法 2：酵素による断片化	19
3. ライブラリ調製	22
Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製	24
Step 2. 末端修復および dA 付加	25
Step 3. 分子バーコードアダプターのライゲーション	27
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製	28
Step 5. アダプター付き DNA ライブラリの増幅	30

Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製.....	33
Step 7. DNA サンプルのサイズチェックと定量.....	35
4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ.....	39
Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付き DNA サンプルのプール.....	40
Step 3. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製.....	46
Step 4. ストレプトアビジンビーズを用いたハイブリダイズ DNA サンプルの回収.....	47
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.....	49
Step 1. キャプチャライブラリの増幅.....	50
Step 2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製.....	53
Step 3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認.....	55
Step 4. (オプション) 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.....	58
Step 5. シーケンスサンプルの調製.....	60
Step 6. シーケンスの開始とデータ解析.....	62
6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用.....	67
FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更.....	68
FFPE サンプルの品質確認.....	68
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨.....	69
7. リファレンス.....	70
キットの内容.....	71
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報.....	73
インデックスプライマーペアのプレートマップ.....	82
トラブルシュートガイド.....	84
クイックリファレンス.....	88



1. はじめに

ワークフロー概要	8
操作に関する注意	9
安全に関する注意	9
実験に必要な試薬	10

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。

NOTE

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

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

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

1. はじめに

ワークフロー概要

プレキャプチャプール方式の SureSelect XT HS2 のワークフローを図 1 に示します。

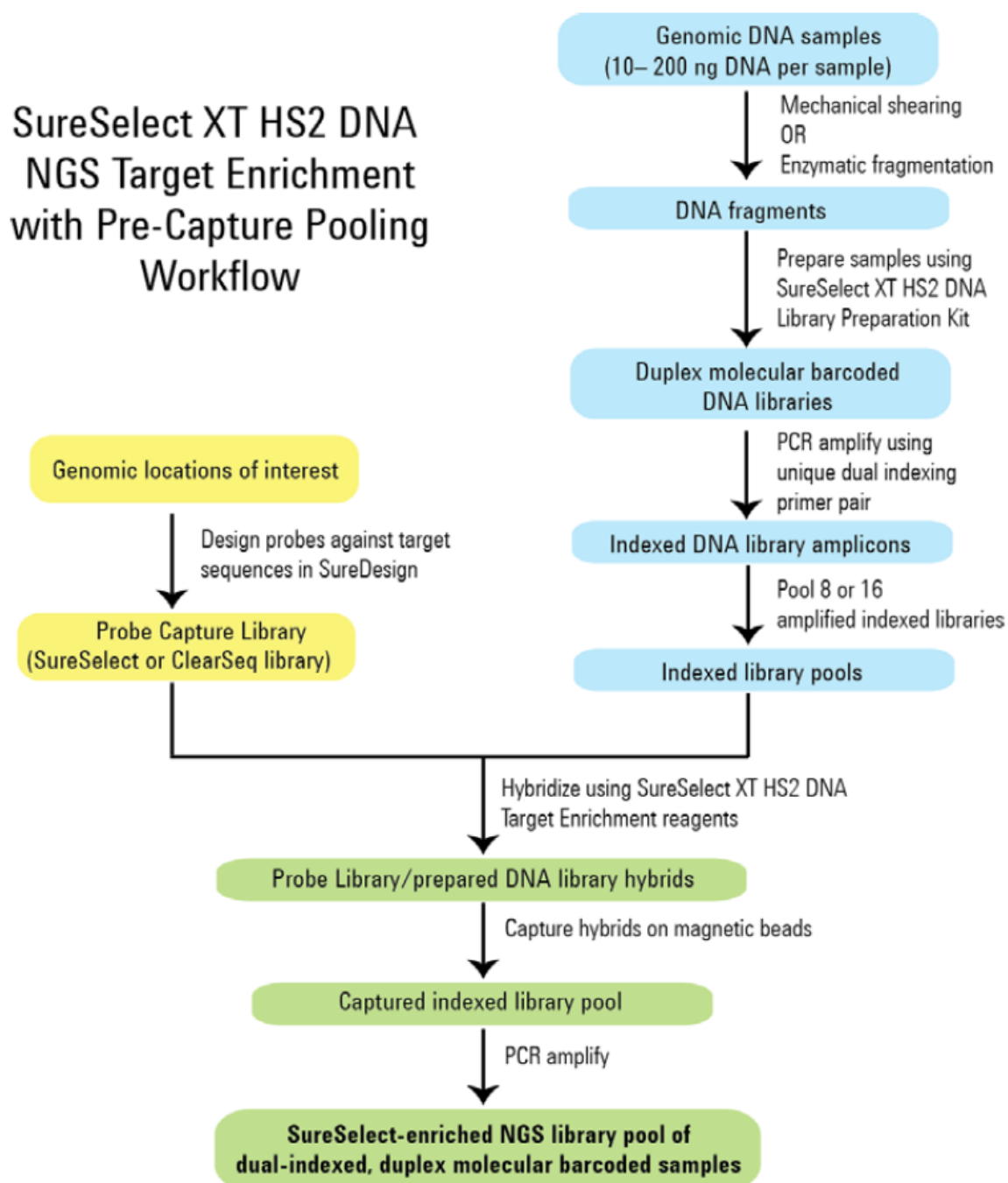


図 1 ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー

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 やその相当品により、日常的に清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ 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。

安全に関する注意

CAUTION

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

1. はじめに

実験に必要な試薬

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

<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=23129>

サポート ■実験前に必要な情報のダウンロードサイトをご覧ください。

SureSelect XT HS2 プレキャプチャプール方式プロトコルは、以下の項目によって必要な消耗品・器具が異なります。

- DNA サンプルタイプ：fresh/fresh-frozen のサンプル由来の質の高い gDNA あるいは FFPE 由来 gDNA
- DNA 断片化の方法：機械（コバリス）による断片化あるいは酵素による断片化

SureSelect は、DNA ライブラリを作製する試薬キットとキャプチャライブラリ（ベイト）を別々に購入いただく構成となっています。表 1 および表 2 を参照に、必ず試薬キットとキャプチャライブラリキットの両方をご購入ください。その他の必要な消耗品や機器は、お使いの DNA サンプルタイプおよび断片化の方法に応じて、表 3 から表 7 を参照してください。

表 1 プレキャプチャプール方式の SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits

プレキャプチャプール方式のSureSelect XT HS2試薬キット					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
SureSelect XT HS2 DNA library preparation kit for ILM (Pre PCR), 96反応分* (いずれか1つ)	Agilent	G9985A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9985B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9985C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9985D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment Kit (Post PCR), 12 Hybs †	Agilent	G9987A	指定	12ハイブリダイゼーション (計96サンプル分)	マルチプレックス対応

*96反応キットには1ランあたりに24サンプル調製する場合の4ラン分に相当する量が含まれます。

†Target Enrichment kit は、XT2フローブを用いて推奨構成の8サンプル/プール(12ハイブリ)または16サンプル/プール(6ハイブリ)のいずれかでプレプールした場合、計96サンプルのターゲットエンリッチメントに対応しています。

表 2 プレキャプチャプール方式対応のプロープ

SureSelect キャプチャライブラリ (ベイト)			
品名	製造メーカー	品番	
設計済みキャプチャライブラリ			
SureSelect HS PreCap Human All Exon V8 (12 Hybs) ‡	Agilent	5191-6877	
SureSelect HS PreCap Human All Exon V7 (12 Hybs) ‡	Agilent	5191-5735	
SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 (12 Hybs) ‡	Agilent	5190-9501	
SureSelect XT2 Mouse All Exon Genome (12 Hybs) ‡	Agilent	5190-4682	
ClearSeq Comprehensive Cancer XT2 (12 Hybs) ‡	Agilent	5190-8018	
ClearSeq Inherited Disease XT2 (12 Hybs) ‡	Agilent	5190-7525	
カスタムプロープ*			
SureSelect Custom Tier1 1-499 kb (6 or 30 Hybs) †	Agilent	カスタムプロープはゲノムをターゲットにして設計できます。 設計方法などはお問い合わせください。	
SureSelect Custom Tier2 0.5-2.9 Mb (6 or 30 Hybs) †	Agilent		
SureSelect Custom Tier3 3-5.9 Mb (6 or 30 Hybs) †	Agilent		
SureSelect Custom Tier4 6-11.9 Mb (6 or 30 Hybs) †	Agilent		
SureSelect Custom Tier5 12-24 Mb (6 or 30 Hybs) †	Agilent		
設計済みキャプチャライブラリに追加する場合			
SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 Plus1 (12 Hybs) ‡	Agilent	カスタムデザインツールSureDesignで設計いただけます。設計方法などはお問い合わせください。	
SureSelect XT Clinical Research Exome V2 Plus2 (12 Hybs) ‡	Agilent		
ClearSeq Comprehensive Cancer Plus XT2 (6 Hybs) ‡	Agilent		
ClearSeq Inherited Disease Plus XT2 (12 Hybs) ‡	Agilent		

* 2020年8月以降に設計されたカスタムプロープは、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プは、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。両方のカテゴリのカスタムプロープは、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。

‡12ハイブリ分のキャプチャプロープは、推奨構成の8サンプル/プールでプールされた計96サンプル分に対応しています(12ハイブリ x 8サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の1ランあたり6ハイブリダイゼーション反応を2ランするために十分な試薬が含まれています。

†6ハイブリ分のキャプチャプロープは、推奨構成の16サンプル/プールでプールされた計96サンプル分に対応しています(6ハイブリ x 16サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の1ランあたり6ハイブリダイゼーションに十分な試薬が含まれています。30ハイブリ分のキャプチャプロープは、推奨構成の16サンプル/プールでプールされた計480サンプル分に対応しています(30ハイブリ x 16サンプル/Hyb)。プロトコル当該ステップに記載の5ランあたり6ハイブリダイゼーションに十分な試薬が含まれています。

表 3 その他の試薬（全てのサンプルタイプおよび断片化方法）

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 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	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 4 その他の機器および消耗品（全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	Q33238	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チューブスピンドウ用。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のスピンドウ用 ・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。
濃縮遠心機	Eppendorf	5305000142	相当		PCRプレート用ローター (A-2-VC) と合わせて使用します。 プレプールのサンプルをPCRプレートまたは8strip tube (1.5 mL tube/0.5 mL tubeも可) で濃縮遠心します。
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					

*各ウェルの一方所に磁気ビーズを集められる分離用マグネットを選択して下さい。リング状に磁気ビーズを集めるタイプの使用はお勧めしません。

1. はじめに

表 5 核酸の QC プラットフォーム – いずれかの装置を選択してください。

ライブラリQC用(お持ちの電気泳動装置に並び、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	G2991BA / 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	Agilent	M5310AA / M5311AA / M5312AA	指定		
Agilent 4150/ 4200 / 2200 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	112サンプル分	
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		4150 TapeStationで使用できます。
96-well plate foil seals	Agilent	5067-5154	指定		4150 TapeStationで使用できます。
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 6 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

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	
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
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	5191-4080 (96反応)	指定		16反応キットもあります(5191-4079)。
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		

表 7 その他オプションの試薬・装置

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
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。
Optical Caps, 8x strip (flat)			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 QCI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。

※ Flat strip cap は ハイブリダイゼーション/キャプチャステップ以外では domed strip cap の代わりに使用することができます。 Flat strip cap の上にシールを貼るとキャップの密着度が向上します。



2. インプット DNA の準備と断片化

Step1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認・・・ 15

Fresh なサンプル由来の質の高い gDNA の場合・・・・・・・ 15

FFPE サンプル由来の gDNA の調製と品質確認・・・・・・・ 15

Step2. DNA の断片化・・・・・・・ 17

方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化・・・・・・・ 17

方法 2：酵素による断片化・・・・・・・ 19

この章では、SureSelect XT HS2 キットを用いたライブラリ調製やターゲットエンリッチメントに先立ち、インプット DNA サンプルの準備、定量、質の評価及び断片化処理のステップを説明します。DNA の断片化には、機械による方法と酵素による方法の 2 つがあります。

本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は、プロトコル全工程において、一部条件を変更する必要があります。FFPE サンプルを使用する際の変更内容のまとめは、67 ページの「6. Appendix：FFPE 由来 DNA サンプルの使用」をご覧ください。

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

Step 1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認

Fresh なサンプル由来の質の高い gDNA の場合

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

NOTE

gDNA サンプルが、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 ds DNA Assay kit を用いて各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。

Fresh なサンプルから調製した DNA は、その後更なる品質確認操作は不要です。17 ページの「Step 2. DNA の断片化」に進みます。

FFPE サンプル由来の 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 ul 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 ul 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 ul 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. 以下のいずれかの方法を用いて、各 FFPE DNA サンプルの品質（分解度）を確認します。

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

Agilent NGS FFPE DNA QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を定めることができます。 $\Delta\Delta Cq$ 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨内容は表 8 をご覧ください。

- 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ご参照ください。
- b. 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 ul を、Agilent NGS FFPE DNA QC Kit 測定用に分注します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。

2. インプット DNA の準備と断片化

- c. $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコア ≤ 1 のサンプルは、すべて step a での Qubit に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。
- d. $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコア >1 のサンプルは、すべて Agilent NGS FFPE DNA QC Kit より得られる qPCR に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。

表 8 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS2 における DNA インプット量の決定

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

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

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

Agilent 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 ul を分取し、Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay を用いて分析します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- c. DIN 値をもとに表 9 の内容を参照し各サンプルのインプット量を決定してください。

表 9 DIN 値に基づく SureSelect XT HS2 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。

Step 2. 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、質の高い gDNA あるいは FFPE 由来 gDNA をそれぞれに適した条件で、50 ul の液量で切断します。

ターゲット断片化サイズとそれに対応した断片化条件は NGS のリード長により異なります。

表 10 にまとめました。詳細な切断条件は 18 ページにあります。

表 10 NGS リード長別のコバリスでの切断時間

NGS read length requirement	Target fragment size	Shearing duration for high-quality DNA samples	Shearing duration for FFPE DNA samples*
2 × 100 reads	150 to 200 bp	2 × 120 seconds	240 seconds
2 × 150 reads	180 to 250 bp	2 × 60 seconds	240 seconds

*FFPE 由来 DNA サンプルは、元の DNA 断片サイズが切断後の断片サイズに影響し、本テーブルに示すよりも短くなることがあります。すべての FFPE 由来サンプルは、ライブラリ構成に適した断片長にするため 240 秒で切断します。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 リード長で解析してください。

NOTE

本プロトコルは、Covaris model E220 装置と 130 ul 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、ターゲットサイズの DNA 断片が得られる条件について、装置取り扱い会社にお問い合わせください。

1. コバリス E220 を起動します。操作の詳細はコバリス社のユーザーズガイドを参照ください。
 - a. 製造元の推奨に従い、最適な高さ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気を行います（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。凍結防止のためのクーラント液の添加については、メーカーの推奨事項を参照してください。
2. 断片化を行う 10～200 ng の gDNA サンプルを 1x Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5-8.0, 0.1mM EDTA) で 50 ul に調製します。ボルテックスでよく混合し、液を集めるため軽くスピンドウンします。サンプルは氷上に置いてください。

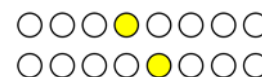
2. インプット DNA の準備と断片化

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 ul 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ドアウンします。その際は右図の黄色の位置に microTUBE をセットします（1.5 mL チューブ用のアタッチメントにはセットすることができません）。外側にセットした場合、遠心力が強すぎチューブが飛ぶ恐れがあります。



- 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 11 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 11 コバリス E シリーズ装置による断片化設定条件 (SonoLab software v7 以降)

Setting	High-quality DNA for 2 × 100 read NGS	High-quality DNA for 2 × 150 read NGS	FFPE DNA (2 × 100 or 2 × 150 read NGS)
Duty Factor	10%	10%	10%
Peak Incident Power (PIP)	175	175	175
Cycles per Burst	200	200	200
Treatment Time	2 × 120 seconds	2 × 60 seconds	240 seconds
Bath Temperature	2° to 8° C	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 秒または 60 秒断片化します（表 11 参照）。
- ・ 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 秒または 60 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。

2. インプット DNA の準備と断片化

- 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、スリット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 ul）を、新しい 96 ウェルプレートもしくは 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、step 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 step g を繰り返してください。

この 50 ul 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。22 ページの「3. ライブラリ調製」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. お使いの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 ng ~ 200 ng の gDNA を最終量 7 ul になるように Nuclease free water で調製します。
2. 5X SureSelect Fragmentation Buffer を融解、ボルテックスで混合し氷上に置きます。
3. サーマルサイクラのサーマルプログラムを表 12 のように設定します。プログラムを開始後すぐに Pause ボタンを押し、step 7 でサンプルをセットするまでそのままにします。

表 12 酵素による断片化のサーマルプロファイル※

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	表 13 を参照
Step 2	65°C	5 minutes
Step 3	4°C	Hold

※サーマルプログラムの反応液量は 10 ul と設定してください。

2. インプット DNA の準備と断片化

断片化条件は、NGS のリード長によって異なります。表 13 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 13 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 12)	
		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 サンプルは、元の DNA 断片サイズが切断後の断片サイズに影響し、本テーブルに示すよりも短くなることがあります。すべての FFPE 由来サンプルは、ライブラリ構成に適した断片長にするため 37 °C 15 分インキュベートします。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 リード長で解析してください。

4. 表 14 を参照に、Fragmentation マスターミックスを調製します。

ピペティングを 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ドウンし氷上に置きます。

表 14 Fragmentation マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 24 reactions* (includes excess)
5X SureSelect Fragmentation Buffer	2 µl	50 µl
SureSelect Fragmentation Enzyme	1 µl	25 µl
Total	3 µl	75 µl

*1 回あたりの最少推奨反応数は 24 サンプルです。次のステップで使用する SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kit for ILM (96 反応) には、24 サンプルを 4 回実験する分の試薬が含まれます。

5. Fragmentation マスターミックス 3 ul を 7 ul 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。軽くスピンドウンします。

2. インプット DNA の準備と断片化

7. すぐにサンプルチューブあるいは PCR プレートを実験サイクラにセットし、スタートボタンを押し表 12 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 のホールドステップになったら、サンプルを実験サイクラから取り出し、40 ul の Nuclease free water を各ウェルに添加後氷上におきます。

この 50 ul 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。22 ページの「3. ライブラリ調製」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. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製	24
Step 2. 末端修復および dA 付加	25
Step 3. 分子バーコードアダプターのライゲーション ..	27
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製	28
Step 5. アダプター付き DNA ライブラリの増幅	30
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製 ..	33
Step 7. DNA サンプルのサイズチェックと定量	35

この章では、イルミナ社のペアエンド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、それぞれデュアルインデックスと分子バーコードを付加します。SureSelect XT HS2 NGS サンプル調製のワークフローは 8 ページの図 1 をご覧ください。

このステップは機械による切断（17 ページ）あるいは酵素による反応（19 ページ）で断片化した 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、10 ~ 200 ng の断片化 DNA が 50 ul に含まれています。

この章のステップでは表 15 の試薬を使用します。使用前に表 15 に記載されているように各試薬を融解し攪拌します（Where used カラムを参照ください）。28 ページのステップで使用する、少なくとも 30 分前までに AMPure XP ビーズを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。

複数サンプルを処理する際は、各ステップで余剰を含む試薬を準備してください（DNA ライブラリ以外）。各表には、余剰分を含んだ 24 反応分のマスターミックス量が記載されています。

表 15 使用前に融解する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	26 ページ
Ligation Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	24 ページ
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	26 ページ
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	24 ページ
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix (white cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	27 ページ

3. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製

2727 ページのステップで使用する前に室温になるよう、ライゲーションマスターミックスを準備します。末端修飾/dA 付加のプロトコルを始める前に、このステップを開始しこの間サンプルは氷上に置いておきます。

1. 融解した Ligation Buffer を高速のボルテックスミキサで 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 プレートで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。

2. 表 16 の試薬を混合し、適切な量の Ligation マスターミックスを調製します。

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入れます。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、ピペットチップ内部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、チューブに蓋をして、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。

27 ページの Step 3. 分子バーコードアダプターのライゲーションで使用するまで、**30~45 分室温に置きます。**

表 16 Ligation マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 24 reactions* (includes excess)
Ligation Buffer (bottle)	23 µl	575 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	50 µl
Total	25 µl	625 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。

Step 2. 末端修復および dA 付加

1. 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 17 の内容に設定します（蓋は加熱します）。開始後すぐに一時停止ボタンを押し、step 5 でサンプルをセットするまで一時停止しておきます。

表 17 末端修復および dA 付加のため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 ul に設定してください。

NOTE

SureCycler 8800 (Agilent)を使用する場合は、RNA ライブラリ調製ステップのインキュベーションステップは蓋の加熱を On（デフォルト設定）にしておきます。増幅およびハイブリダイゼーションステップでは、サーマルサイクラの蓋を加熱しておく必要があります。

2. 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。

3. 表 18 を参照し、適切な量の末端修復および dA 付加のマスターミックスを調製します。

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。末端修復および dA 付加のマスターミックス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

3. ライブラリ調製

繰り返すか、もしくはチューブ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、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 18 末端修復および dA 付加のマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 24 reactions (includes excess)
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	16 μ l	400 μ l
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 μ l	100 μ l
Total	20 μl	500 μl

4. 50 μ l の断片化 DNA の入った各サンプルチューブ (well) に 20 μ l の末端修復および dA 付加のマスターミックスを加えます。50 μ l 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、もしくはウェル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。
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いれます。Play ボタンを押し、表 17 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。

Step 3. 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 19 の内容に設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 19 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

* サーマルサイクルプログラムでの反応量は 100 ul 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 ul）に、Ligation マスターミックス（24 ページで調製済み、室温に保存）を 25 ul 加えます。70 ul 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、もしくはウェル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、軽く遠心を行ないます。
4. SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix（白色の蓋のチューブ）を 5 ul、各サンプルに加えます。70 ul に設定したピペットで 15~20 回ピペッティングを行うか、もしくはウェル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 マスターミックスと Adaptor Oligo Mix は必ず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いれます。Play ボタンをおし、表 19 のとお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

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

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。

3. ライブラリ調製

Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ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 ul （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 ul を、前項で調製した DNA サンプル（液量約 100 ul）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、もしくはウェル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 ul 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 1 と 9 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ドウンし、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 ul の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
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 ul 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。軽くスピンドウンします。
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 は溶液のほうに移動しています。
17. 上澄み液（液量 約 34 ul）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 が移動しているので、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 ul 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 ul にセットした 20 ul 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。

3. ライブラリ調製

Step 5. 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。開始前に表の試薬を溶かし、氷上に置きます。

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 HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	31 ページ
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	31 ページ
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	31 ページ

*インデックスプライマーは、ストリップチューブ（16 反応キット）またはプレート（96 反応）で提供されています。

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 8 bp のインデックス部分の配列は「[7. リファレンス](#)」の表 51~表 58 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。

CAUTION

SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs には 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、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）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、step 6 でサンプルをロードするまで一時停止します。

表 21 プレキャプチャ PCR のサーマルプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	イクル数は 表 22 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 ul 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 の試薬を混合して、適切な量のキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix を氷上で調製します。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 反応マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 24 reactions (includes excess)
5× Herculanase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µl	250 µl
Herculanase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	25 µl
Total	11 µl	275 µl

4. 表 23 の内容で調製したキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix 11 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 µl）に加えます。
5. 各反応液に、それぞれ適した SureSelect XT HS2 Index Primer Pair を 5 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、軽くスピンドウンし、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のブロックに入れ、蓋を閉めます。

3. ライブラリ調製

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。

Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ（4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください）を室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70 % エタノールを、1 サンプルあたり 400 ul（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 ul を、増幅反応液（液量 50 ul）が入った 8 strip tube もしくは PCR プレートに注意して加えます。ピペッティングを 15~20 回程度行いか、もしくはウェル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 ul 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 9 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ドウンし、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 ul の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
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 ul の Nuclease-free water を加えます。

3. ライブラリ調製

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。軽くスピンドウンします。
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 ul）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 ul 全量を回収できないこともあります。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。

Step 7. DNA サンプルのサイズチェックと定量

5 倍に希釈した各サンプルを表 24 のいずれかのプラットフォームを用いて確認します。各プラットフォームの操作説明書は弊社サポートサイトをご覧ください。アッセイ後 SureSelect ライブラリの定量をします。どちらの装置でもエレクトロフェログラムはサンプル中の断片のサイズ分布を示し、サンプル中の DNA 濃度を判定します。様々なサンプルタイプのサイズ分布のガイドラインは表 25 を参照してください。複数の DNA タイプから作製されたライブラリの典型的な結果として、TapeStation システムで得られる代表的なエレクトロフェログラムを示しています。

表 24 キャプチャ前ライブラリの分析オプション

Analysis platform	Assay used at this step	Link to assay instructions	Amount of library sample to analyze
Agilent 4200 or 4150 TapeStation system	D1000 ScreenTape	Agilent D1000 Assay Quick Guide	1 µl of five-fold dilution
Agilent 2100 Bioanalyzer system	DNA 1000 Kit	Agilent DNA 1000 Kit Guide	1 µl of five-fold dilution
Agilent 5200, 5300, or 5400 Fragment Analyzer system	NGS Fragment Kit (1-6000bp)	Agilent NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Kit Guide	2 µl of five-fold dilution

表 25 キャプチャ前ライブラリのガイドライン

NGS read length for fragmentation protocol selection	Fragmentation method	Input DNA type	Expected library DNA fragment size peak position
2 × 100 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	300 to 400 bp
		FFPE DNA	200 to 400 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	300 to 400 bp
		FFPE DNA	200 to 400 bp
2 × 150 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	330 to 450 bp
		FFPE DNA	200 to 450 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	330 to 450 bp
		FFPE DNA	200 to 450 bp

1. 使用する装置の操作説明書に従い装置をセットアップします。
2. 泳動する各ライブラリサンプル 1 µl を Nuclease free water 4µl で希釈します。
3. 操作説明書に従い希釈したサンプルを調製し、アッセイを準備します。使用する装置でランを完了します。

3. ライブラリ調製

CAUTION

TapeStation を使用する場合は、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、全ウェルを確実に混合してください。

- 泳動終了後エレクトロフェログラムで期待される DNA フラグメントサイズのピークが得られているか確認します（表 25 のガイドを参照ください）。2 x 100 bp リード用に断片化された DNA から作製されたライブラリのエレクトロフェログラム例は図 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）および図 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。
表 24 にある他のプラットフォームオプションで得られたエレクトロフェログラムも同様な断片サイズとなることが期待されます。
- 解析ソフトウェアの Region 機能などを用いて、ピーク全体から各ライブラリの濃度を確認します。より高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。

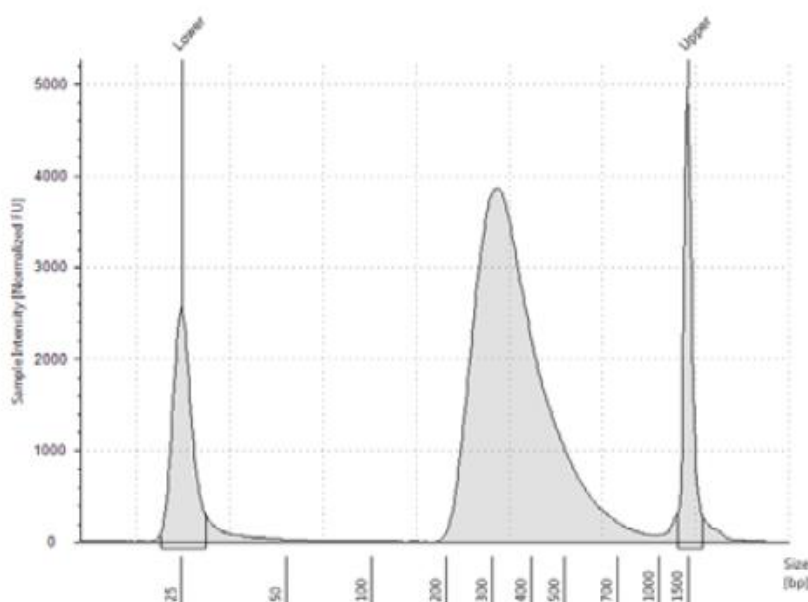


図 2 機械で断片化された高品質な gDNA サンプルから調製したキャプチャ前ライブラリの泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

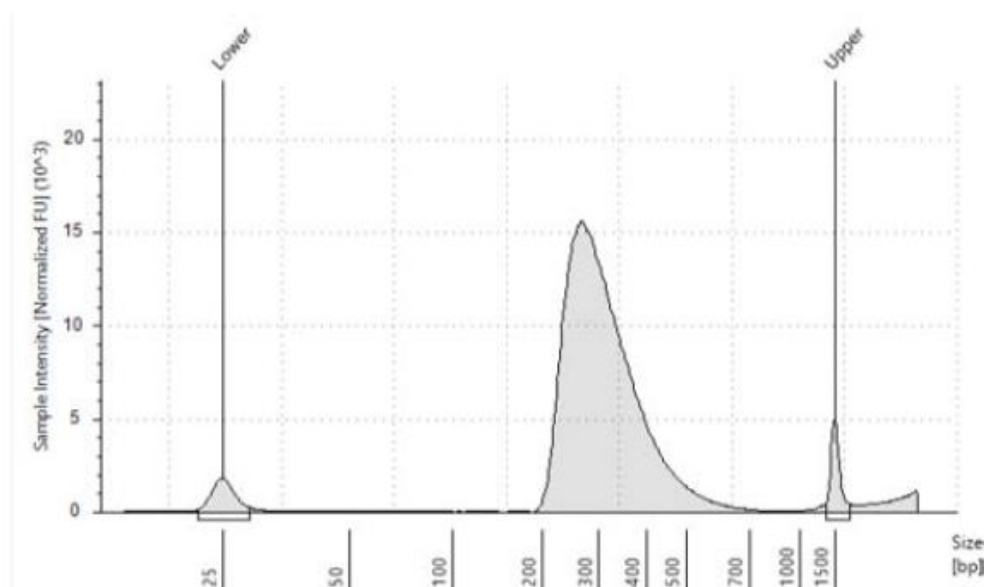


図 3 典型的な FFPE gDNA サンプル（機械による断片化）から調製したキャプチャ前ライブラリの泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

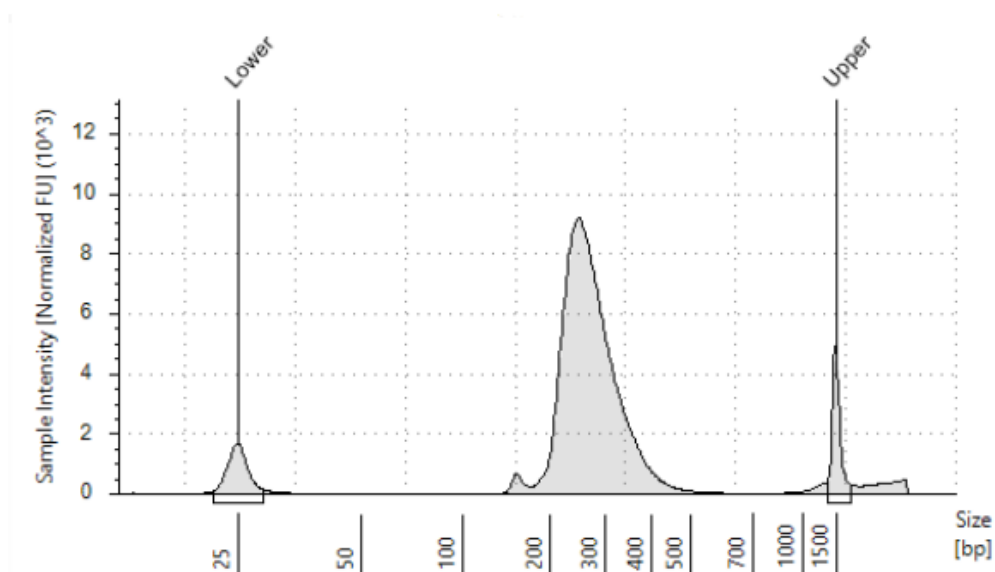


図 4 低品質 FFPE gDNA サンプル（機械による断片化）から調製したキャプチャ前ライブラリの泳動図（D1000 ScreenTape アッセイ）

期待されるライブラリ断片のピークに加え低分子のピークが観察された場合は、ライブラリにアダプターダイマーが含まれます。図 4 に示すように観察されたアダプターダイマーが少量であれば、ターゲットエンリッチメントに進むことが可能です。その他については 85 ページのトラブルシューティングガイドをご覧ください。

3. ライブラリ調製

NOTE

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）の場合は、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 ul に希釈し、33 ページの「Step 6. 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。

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

Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付き DNA サンプルのプール	40
Step 2. DNA サンプルのプロープへのハイブリダイゼーション	41
Step 3. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製	46
Step 4. ストレプトアビジンビーズを用いたハイブリダイズ DNA サンプルの回収	47

この章では、前章で調製したインデックス付きの gDNA ライブラリをプールした後に、ターゲット特異的なプロープとハイブリダイズするステップを説明します。インデックス付きの 8 または 16 サンプルのプール産物は適切なプロープとハイブリダイズし、ストレプトアビジンビーズでキャプチャされます。

ハイブリダイゼーションの際に混合する DNA ライブラリの総量とインデックス付きサンプルの推奨数は、キャプチャプロープによって異なります。推奨は表 26 をご覧ください。

SureSelect XT HS2 の標準的な 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 43 ページ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

プロープと 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・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をし、さらに使用するハイブリダイゼーションの条件で 4 ul 以上の溶液の蒸発がないか確認してください。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付き DNA サンプルのプール

このステップでは、プローブとのハイブリダイゼーションを行う前に、インデックス付き gDNA ライブラリサンプルをプールし、12 uL に調製します。

ハイブリダイゼーションに用いる特異的なプローブデザインに応じて、各ハイブリダイゼーション反応には等量の 8 または 16 ライブラリで構成される計 3 ug または 1.5 ug のインデックス付き gDNA が必要です。ハイブリダイゼーションに使用する各キャプチャライブラリの推奨 gDNA プール内容は表 26 を参照してください。

表 26 プレキャプチャプールの推奨

Probe description	Total amount of indexed gDNA pool used for hybridization	Number of indexed gDNA libraries per pool	Amount of each gDNA library in pool
SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8	3 µg	8	375 ng
SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V7	1.5 µg	8	187.5 ng
SureSelect XT2 Mouse All-Exon	1.5 µg	8	187.5 ng
SureSelect Clinical Research Exome	1.5 µg	8	187.5 ng
SureSelect Focused Exome	1.5 µg	8	187.5 ng
ClearSeq Inherited Disease	1.5 µg	8	187.5 ng
ClearSeq Comprehensive Cancer	1.5 µg	16	93.75 ng
SureSelect Custom Probes	1.5 µg	16	93.75 ng

1. キャプチャ反応プールごとに、適切な量の各インデックス付き gDNA ライブラリサンプルをストリップチューブまたは PCR プレートの 1 つのウェルに混合します。最終的なキャプチャ反応プールは 3 ug または 1.5 ug のインデックス付き gDNA が必要です。
2. 濃縮遠心機を 45 °C 以下に設定し、各ウェルが 12 uL 未満になるように濃縮遠心機で液量を減らします。
完全にサンプルを乾燥させないでください。プールサンプルを過剰に乾燥させるとターゲットエンリッチメントに影響が出ます。
3. 各濃縮した gDNA プールサンプルを最終量 12 uL になるように nuclease free water で調製します。
4. ストリップチューブまたはプレートのウェルに蓋をし、ボルテックスで 30 秒しっかりと混合します。遠心機かミニプレートスピナーでスピンドウンし、底に液を集め 43 ページで使用するまで氷上に置いておきます。

Step 2. DNA サンプルのプロープへのハイブリダイゼーション

このステップではプロープに応じたハイブリダイゼーション条件で、インデックス付き gDNA ライブラリのプール産物をターゲット特異的なプロープとハイブリダイズします。このステップでは表 27 に示す試薬を使用します。各試薬を表に記載されている条件にて溶解します。各試薬をボルテックスミキサーで攪拌し、軽く遠心をし、液を底に集めます。

表 27 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 HS2 Blocker Mix (blue cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	43 ページ
SureSelect RNase Block (purple cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	43 ページ
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw and keep at Room Temperature	44 ページ
Probe Capture Library	-80°C	Thaw on ice	44 ページ

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

1. SureSelect XT HS Human All Exon V8 Probe を使用する場合は表 28、それ以外のキャプチャプローブは全て表 29 に従いサーマルサイクラのプログラムを設定します（蓋は加熱します）。
プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 28 SureSelect XT HS Human All Exon V8 Probe 使用時のハイブリダイゼーションプログラム*

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 cyclor here for reagent addition; see step 6 on p. 44)
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C	60 minutes
6	1	65°C	Hold briefly until ready to begin capture steps on p. 47

* 反応量は 30 ul に設定してください（Segment4 のサイクルでの最終反応液量）。

表 29 他のプローブを使用する場合の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 cyclor here for reagent addition; see step 6 on p. 44)
4	60	65°C [†]	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C [†]	Hold briefly until ready to begin capture steps on p. 47

* 反応量は 30 ul に設定してください（Segment4 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 XT2 Human All Exon V6 や SureSelect XT2 Clinical Research Exome V2 など SureSelect XT2 プラットフォームは 62.5 °C、SureSelect XT2 システム用に設計されたカスタムプローブは 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。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

NOTE

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 28 または表 29）の最終セグメントを 65 °C Hold から 21 °C Hold にします。
- ・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。47 ページのキャプチャステップを始める直前までに、46 ページ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. 12 µL のプールした DNA ライブラリの各ウェルに、SureSelect XT HS2 Blocker Mix 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ーで 5 秒間攪拌し混合します。軽くスピンド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。

3. 蓋をしたサンプルプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに移しサーマルプログラム（表 28 または表 29）を開始します。

重要：44 ページのステップ 6 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 Segment 3 で一時停止する必要があります。

Segment 1、2 の待ち時間にステップ 4 および 5 で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 で一時停止した後に、これらの調製ステップを完了しても構いません。

4. 表 30 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 30 RNase Block Solution の調製

Reagent	Volume for 1 Hyb reaction	Volume for 6 Hyb reactions (includes excess)
SureSelect RNase Block	0.5 µl	3.5 µl
Nuclease-free water	1.5 µl	10.5 µl
Total	2 µl	14 µl

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

NOTE

サーマルサイクラを Segment 3 で一時停止する直前に、ステップ 5 の試薬を調製します。調製した試薬はステップ 6 で DNA サンプルに加えるまで室温に置く必要があります、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おかないでください。

5. 使用するプローブデザインサイズに応じて、Probe Hybridization Mix を調製します。

ターゲットサイズが 3 Mb 以上のキャプチャプローブは表 31、3 Mb 未満のキャプチャプローブは

6. 表 32 を参照してください。

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で 5 秒間攪拌しよく混合したあと、軽くスピンドウンします。すぐにステップ 6 に進みます。

表 31 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 Hyb reaction	Volume for 6 Hyb reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 4)	2 µl	14 µl
Probe (with design ≥3 Mb)	5 µl	35 µl
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 µl	42 µl
Total	13 µl	91 µl

表 32 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 Hyb reaction	Volume for 6 Hyb reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 4)	2 µl	14 µl
Probe (with design <3 Mb)	2 µl	14 µl
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 µl	42 µl
Nuclease-free water	3 µl	21 µl
Total	13 µl	91 µl

7. サーマルプログラムの Segment 3 (65 °C 1 分間の反応) が始まったら、サーマルプログラムを一時停止します。一時停止したまま、ステップ 5 で調製して室温に置いてある Probe

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Hybridization Mix 13 ul を、DNA と Blocker 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。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 ul になっています。

8. プレートもしくは 8 strip tube を新しい domed 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、全てのウェルを確実に密閉します。軽くボルテックスをして、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除き、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 Cap Strip を使用してください。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。

9. サーマルサイクラのプログラムを再開し、DNA サンプルとプローブをハイブリダイズします。

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・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 ul 以上の溶液が蒸発しないことを確認してください。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Step 3. 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 33 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、45 ページのステップ 8 のハイブリダイゼーションを開始した約 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、2 日目は 47 ページ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 33 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	46 ページ
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	47 ページ
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	47 ページ
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Beads	4°C	46 ページ

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ストレプトアビジン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 ul 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 ul の SureSelect Binding Buffer を加えます。
 - b. 20 回ピペティングするか、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、軽くスピンドウンします。
 - 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. 5 分または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。
 - e. step a ~ step d の工程をさらに 2 回繰り返し、トータルで 3 回洗浄を行ないます。
4. ビーズを 200 ul 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、まとめて磁気ビーズを洗浄することも可能です。

Step 4. ストレプトアビジンビーズを用いたハイブリダイズ DNA サンプルの回収

1. ストレプトアビジンビーズの調製が終了し、ハイブリダイゼーションのサーマルプログラム最後の Hold ステップ（42 ページ 表 28 または表 29）に到達したら、サンプルをサーマルサイクラから出し室温におきます。
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 ul）を、洗浄済み磁気ビーズ 200 ul 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 domed 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、1400~1900 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な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、以下の手順で 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 ul ずつ各ウェルに入れます。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 step 9 まで保温して置きます。
5. step 3 の 30 分間が終了したら、サンプルを軽くスピンド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 ul 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、その他温度の振れ幅が大きい装置は使用しないでください。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

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 ul、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 domed 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ド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. step a~step e をさらに 5 回繰り返します。トータルで洗浄を 6 回行ないます。

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 ul 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。

52 ページのステップ 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まで、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

Step 1. キャプチャライブラリの増幅	50
Step 2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製	53
Step 3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	55
Step 4. (オプション) 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	58
Step 5. シーケンスサンプルの調製	60
Step 6. シーケンスの開始とデータ解析	62

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なう工程を示しています。マルチプレックスシーケンスのために、インデックスと分子バーコードが含まれるサンプルを調製し、オプションでポストプールする内容も含まれています。シーケンスのラン設定やデータ解析のステップはお使いの NGS プラットフォームやデータ解析パイプラインによって異なります。これらのステップのガイドラインもこの章に含まれています。

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

Step 1. 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 34 に示す試薬を使用します。表 34 に記載されている各試薬を溶かし氷上に置きます。53 ページで使用する AMPure XP ビーズを使用する少なくとも 30 分前までに、4 °C から室温に移動します。ビーズは絶対に凍らせないでください。

表 34 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 HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	52 ページ
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	52 ページ
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	52 ページ

各キャプチャされた DNA ライブラリプール 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。

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

1. サーマルサイクラのプログラムを表 35 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すぐに一時停止し、step 5 でサンプルをセットするまで停止しておきます。

表 35 キャプチャ後 PCR 増幅サーマルサイクラプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10–16 キャプチャライブラリのサイズに基づいた サイクル数の推奨は表 36 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液量は 50 ul に設定してください。

表 36 キャプチャ後 PCR サイクル数の推奨

Capture Library Size/Description	Cycles
Probes <0.2 Mb	16 cycles
Probes 0.2–3 Mb	12–16 cycles
Probes 3–5 Mb	11–12 cycles
Probes >5 Mb (including Human All Exon probes)	10–11 cycles

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

- 表 37 を参照し、適切な量のキャプチャ後 PCR 反応マスターミックスを調製し、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 37 キャプチャ後 PCR 反応マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 amplification reaction	Volume for 6 amplification reactions (includes excess)
Nuclease-free water	13 µl	91 µl
5× Herculanase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µl	70 µl
Herculanase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	7 µl
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 µl	7 µl
Total	25 µl	175 µl

- 表 37 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.48 で調製後、氷上に保存）が 25 µl 入った各サンプルウェルに加えます。
- PCR 反応液を、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。サンプルがウェルの壁面にはね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ドウン しないでください。
- PCR プレートもしくは 8 strip tube に新しい domed 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 35 のサーマルサイクラプログラムを開始します。
- PCR 増幅反応が完了したら、PCR プレートもしくは 8 strip tube を軽くスピンドウンします。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。

Step 2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ（4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。）を室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70 % エタノールを、1 サンプルあたり 400 μ l（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 μ l）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 μ l 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、もしくはウェル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。各サンプルウェルが、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 μ l 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 9 をもう一度繰り返します。計 2 回洗浄を行ないます。各サンプルウェルのエタノールをなるべく全て取り除きます。
11. PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、軽くスピンドウンし残ったエタノールを底に集めます。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 μ l 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。

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

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 ul の Low TE 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。軽くスピンドウンし液を底に集めます。ビーズを沈殿させないように注意します。
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 ul）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。

Step 3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認

表 38 のいずれかのプラットフォームを用いて各ライブラリを確認します。各プラットフォームの操作説明書は弊社サポートサイトをご覧ください。アッセイ後ポストキャプチャライブラリを評価します。様々なサンプルタイプのサイズ分布のガイダンスは表 40 をご覧ください。ポストキャプチャライブラリの典型的結果として、TapeStation システムで得られる代表的なエレクトロフェログラムを示しています。

表 38 ポストキャプチャライブラリの分析オプション

Analysis platform	Assay used at this step	Link to assay instructions	Amount of library sample to analyze
Agilent 4200 or 4150 TapeStation system	High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide	2 µl
Agilent 2100 Bioanalyzer system	High Sensitivity DNA Kit	Agilent High Sensitivity DNA Kit Guide	1 µl
Agilent 5200, 5300, or 5400 Fragment Analyzer system	HS NGS Fragment Kit (1-6000bp)	Agilent HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Kit Guide	2 µl

表 39 ポストキャプチャライブラリのガイドライン

NGS read length for fragmentation protocol selection	Input DNA type	Expected DNA fragment size peak position
2 × 100 reads	Intact DNA	200 to 400 bp (see Figure 5 for sample electropherogram)
	FFPE DNA	200 to 400 bp (see Figure 6 and Figure 7 for sample electropherograms)
2 × 150 reads	Intact DNA	230 to 450 bp
	FFPE DNA	200 to 450 bp

1. 各装置の操作説明書に従い装置をセットアップします。
2. 操作説明書の内容に従いサンプルを調製しアッセイを準備します。サンプルをロードしランを完了します。

CAUTION

バイオアナライザの 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。定量範囲よりも濃度が濃い場合、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。

5. マルチブックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

- 泳動終了後のエレクトロフェログラムで、想定されるサイズの DNA フラグメントが得られているか確認します（表 39 を参照してください）。TapeStation システムで得られた、2 x 100 bp リード用に断片化した DNA から調製したライブラリの泳動例は図 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。
表 38 にあるほかのプラットフォームオプションで得られたエレクトロフェログラムも同様な断片サイズとなることが期待されます。
- 解析ソフトウェアの Region 機能などで、ピーク全体から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。

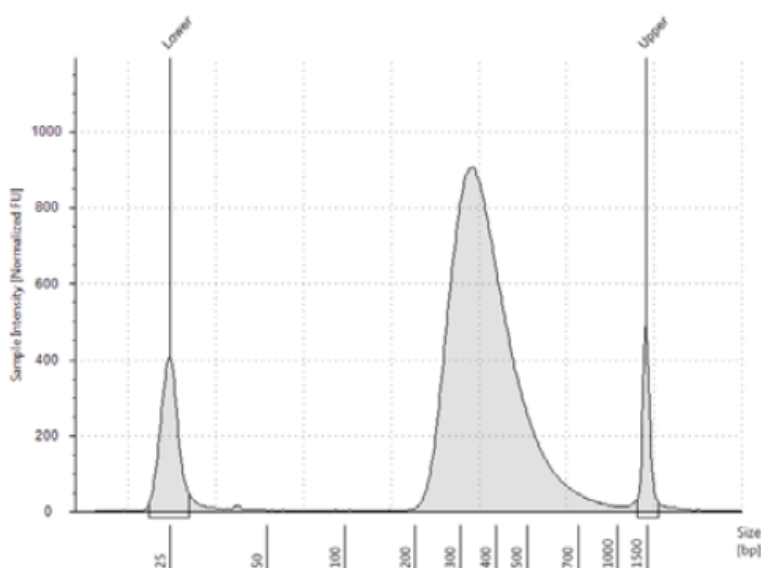


図 5 高品質な gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

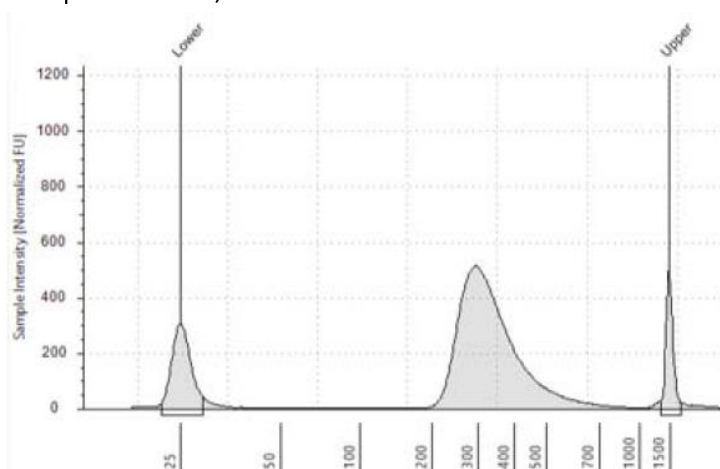


図 6 典型的な FFPE 由来 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

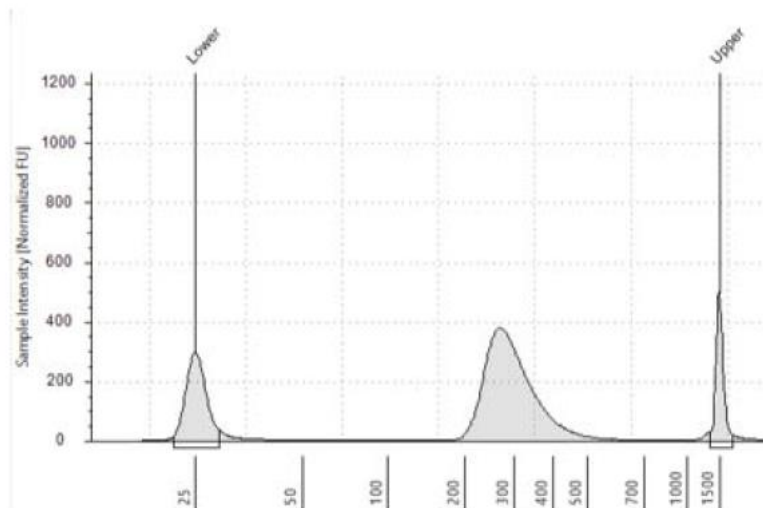


図 7 低品質な FFPE 由来 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

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で一晩保存可能です。(さらに長期保存の場合は- 20 °Cで保存してください。)
-----------------------	--

Step 4. (オプション) 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

キャプチャされた最終 DNA サンプルは、使用したプローブキャプチャライブラリやプレキャプチャプールの方法により、8 または 16 サンプルのインデックス付きライブラリがプールされています。お使いのシーケンシングプラットフォームによっては、8-plex または 16-plex サンプルをポストキャプチャのステップでさらに混合することができます。

ポストキャプチャでプールするかは、実験デザイン上必要なシーケンスデータ量と共に、使用するプラットフォームの出力性能に基づき 1 レーンで混合できるインデックス数を計算することで決定します。ポストキャプチャでプールする場合は、以下のガイドラインに従ってください。ポストキャプチャ後にプールしない場合は、60 ページに進みます。

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

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

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

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

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

#: プールするインデックスの数

C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 40 に 4 種のインデックスサンプル（それぞれ異なる濃度）の量と、最終的に 20 ul の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

NOTE

液量を減らす必要がある場合は濃縮遠心機を使用し、サンプルのロスを抑えるため過剰にライブラリプールを乾燥しないようにしてください。

表 40 10 nM の濃度でトータル 20 μ l に調製する計算例

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

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

Step 5. シーケンスサンプルの調製

最終的な SureSelect XT HS2 ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な 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 8 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフには含まれている状態です。



図 8 SureSelect XT HS2 シーケンスライブラリの構造

各断片では、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ト（黒）とユニークデュアルインデックス（赤および緑）、Duplex 分子バーコード（茶）、ライブラリブリッジ PCR プライマ（黄）が付加されています。

ライブラリはイルミナ社 HiSeq、MiSeq、NextSeq、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 41 をご覧ください。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスタ増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は表 41 に示されています。

SureSelect XT HS2 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 41 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 41 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。

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

表 41 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	230–240 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

Step 6. シーケンスの開始とデータ解析

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンスのランセットアップと解析の概要です。

- サンプルレベルインデックスには 8 bp のインデックスリードが必要です。インデックス塩基配列情報については、74 ページ表 51 から 81 ページ表 58 をご参照ください。
- 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ないます。63 ページ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。63~64 ページ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 社の bcl2fastq ソフトウェアでデマルチプレックスを行い、デュアルインデックスに基づいたペアエンドリードを作成し、P5 および P7 の間違ったペアを除きます。
- 分子バーコード (MBC) と dark base は、リード 1 およびリード 2 の 5'端にあります。MBC 除去とトリミングは Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) を使用してください (詳細は 65 ページを参照してください)。もしお使いのシーケンス解析パイプラインに MBC 解析がなく AGeNT と互換性がない場合、66 ページの Note にあるように、アライメント前に各リードの最初の 5 塩基をトリミングするかマスクしてください。
- リファレンスゲノムにリードをアライメントする前に、アダプター配列中の MBC を適切に処理できるアジレント AGeNT のトリマーモジュールで Illumina アダプター配列をリードから除く必要があります。詳細は 65 ページを参照してください。Illumina Experiment Manager (IEM)のアダプタートリミングのオプションは使用しないでください。シーケンスのラン設定をする際に、IEM のアダプタートリミングオプションのチェックボックスは外れていることを確認してください。

【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、表 42 に従ってシーケンスのランセットアップを行います。HiSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面の Run configuration スクリーンで Dual Index を選び表 42 のサイクル数を入力します。

NextSeq または NovaSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面で Run Setup スクリーンを立ち上げ表 42 のリード長を入力します。カスタムプライマーセクションでは、すべてのプライマー（Read1, Read2, Index1 および Index2）のチェックボックスを外します。

表 42 ラン設定

Run Segment	Cycles/Read Length
Read 1	100 or 150
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	100 or 150

【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 HS2 インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS2 システムのインデックス塩基配列は、74～81 ページを参照してください。

カスタム Sample Sheet のセットアップ

1. IEM ソフトウェア中で、以下の Workflow を選択し、MiSeq プラットフォームの Sample Sheet を作成します。

- Category から Other を選択
- Application から FASTQ Only を選択

2. Workflow Parameters 画面上で、ラン情報を入力し、下図でハイライトしているキーとなるパラメータが、下図の内容になっていることを確認します。

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。アダプタートリミングはアジレン

5. マルチブックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

ト AGeNT で行う必要があるため、FASTQ Only Workflow-Specific Setting の adaptor-trimming チェックボックス（下図赤で囲んだ部分）は両方とも外します。

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。

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

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 HS2 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。I5 インデックスも後のステップで SureSelect XT HS2 インデックスに入力内容を変更します。

EM Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Sample Project	Description
1	1	Plate1	A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT		
2	2	Plate1	A02	D702	TCCGGAGA	D501	TATAGCCT		
3	3	Plate1	A03	D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT		
4	4	Plate1	A04	D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT		
5	5	Plate1	A05	D705	ATTCAGAA	D501	TATAGCCT		
6	6	Plate1	A06	D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT		

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

SureSelect XT HS2 デュアルインデックスを含めるための Sample Sheet の編集

- Sample Sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、コラム 5~8 の I7、I5 のインデックス情報を変更します（下図、黄色くハイライトされた部分）。SureSelect XT HS2 インデックスの塩基配列は 74~81 ページをご覧ください。
- 5 番目の I7_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。6 番目の index カラムには、適切な P7 インデックス配列を入力します。
- 7 番目の I5_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。8 番目の index2 カラムには、適切な P5 インデックス配列を入力します。
- 96 サンプル以上のランを行うときには、SureSelect XT HS2 インデックスペア配列が 6 番目のカラム（P7 インデックス）と 8 番目のカラム（P5 インデックス）を含むサンプル行を Sample Sheet に追加します。

[Header]								
Investigator Name	NN							
Project Name	Sequencing Project A							
Experiment Name	Experiment 1							
Date	3/20/2019							
Workflow	GenerateFASTQ							
Assay	SureSelect XT HS V2							
Chemistry	SureSelect XT HS V2							
[Reads]								
	100							
	100							
[Settings]								
OnlyGenerateFASTQ	1							
[Data]								
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	Sample
Sample 1	Sample1	Plate1	A01	01	CAAGGTGA	01	ATGGTTAG	
Sample 2	Sample2	Plate1	A02	02	TAGACCAA	02	CAAGGTGA	
Sample 3	Sample3	Plate1	A03	03	AGTCGCGA	03	TAGACCAA	

図 9 SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンスのための Sample Sheet

5. ランを行うために編集した Sample Sheet を適切な場所に保管します。

【データ解析リソース】

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 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。

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

Illumina の bcl2fastq ソフトウェアを用いて、デュアルインデックスに基づいてデマルチプレックスを行い、ペアエントリードを作成し、不正確な P5 および P7 インデックスペアの配列を除去します。

デマルチプレックスを行った FASTQ データは、Agilent Genomics NestGen Toolkit (AGeNT) を用いて前処理し、シーケンシングアダプタの除去および分子バーコード (MBC) 配列の抽出を行う必要があります。AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、MBC 処理したアダプタトリミングとデュプリケートリードを認識します。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ティング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 ページをご覧ください。

NOTE

お使いの解析パイプラインで MBC を除く場合、次の解析ステップに進む前にリード 1 およびリード 2 の最初の 5 塩基をマスキングまたはトリミングすることで除けます。マスキングでデマルチプレックスをすることで除くには、ベースマスク **N5Y*,I8,I8,N5Y*** (*は実際のリード長に置き換えてください。RunInfo.xml ファイルのリード長です) を含めてください。もしくは最初の 5 塩基は、seqtk のような適切な処理ツールでデマルチプレックスした fastq ファイルからトリミングされます。あるいは、AGeNT のトリミングモジュールで MBC に加えアダプター配列も除去できます。標準的なアダプタートリマーは、MBC の反対側のアダプター (図 8 参照) を除くことができない場合があります。

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 MBC タグがアラインした BAM ファイルに付加されます。アライメントとタグ付けが完了すると、AGeNT LocateIt モジュールが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に使用できます。BAM ファイルはバリエーションディスカバリを含む下流の解析に使用できます。



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	68
FFPE サンプルの品質確認	68
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	69

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。

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

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 43 に示します。

表 43 FFPE サンプルのためのプロトコル変更内容一覧

Workflow Step and page	Parameter	Condition for non-FFPE Samples	Condition for FFPE Samples
gDNA Sample Preparation p. 15	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
DNA input for Library Preparation p.15	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity (see Table 8 on p.16 and Table 9 on p.16)
DNA Shearing p. 18	Mode of DNA Shearing	2 × 120 seconds (for 2 × 100 reads) 2 × 60 seconds (for 2 × 150 reads)	240 seconds (continuous, for all read lengths)
Enzymatic Fragmentation of DNA p.31	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	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing p. 69	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity (see Table 44 and Table 45 on p. 69)

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 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解スコアを元に、他のプロトコル変更内容を決定します。

Agilent 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 44 のガイドラインをご参照ください。例えば、ワークフローにおいて必要とされるカバレッジを得るためには、分解していない DNA サンプルで 100 Mb のアウトプットが必要な場合、ΔΔCq DNA が 1 の FFPE サンプルで、同程度のカバレッジを得るためには、200 ~ 400 Mb のシーケンスアウトプットが必要となります。

表 44 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 45 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 45 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

キットの内容	71
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報	73
インデックスプライマーペアのプレートマップ ...	82
トラブルシュートガイド	84
クイックリファレンス	88

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

キットの内容

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントシステム プレキャプチャプールのプロトコルでは表 46 に示す試薬キットを使用します。表 46 で複数のキットから構成される製品の構成品は、表 47 から表 50 に示します。

表 46 キットの構成品

Kit Name (p/n)	Component Kit Name	Component Kit p/n	Storage Condition
SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), 96 Reactions (G9985A through G9985D)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	5500-0147	–20°C
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	5191-5688 (Index Pairs 1–96), 5191-5689 (Index Pairs 97–192), 5191-5690 (Index Pairs 193–288), OR 5191-5691 (Index Pairs 289–384)	–20°C
	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	5191-6689	Room Temperature
	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	5191-6690	–20°C

表 47 SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (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
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix	tube with white cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

7. リファレンス

表 48 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)の内容

Kit Component	Format
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	Orange 96-well plate (index pairs 1–96), OR Blue 96-well plate (index pairs 97–192), OR Green 96-well plate (index pairs 193–288), OR Red 96-well plate (index pairs 289–384)

表 49 SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box1 (Post PCR)の内容

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

表 50 SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box2 (Post PCR)の内容

Kit Component	Format
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle
SureSelect XT HS2 Blocker Mix	tube with blue cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap
SureSelect Post-Capture Primer Mix	tube with clear cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは混合された状態で提供されます。各プライマーペアはユニークな 8 bp の P5 または P7 インデックスを含み、デュアルインデックスの NGS ライブラリを作成できます。各プライマーのインデックス部分の塩基配列は、74 ページ表 51 から 81 ページ 表 58 を参照してください。8 bp インデックスのライブラリをシーケンスするラン設定は、62 ページをご覧ください。

NOTE

P7 インデックスの配列は、イルミナプラットフォームのいずれにも対応した一方向で示しています。P5 インデックスは異なるプラットフォームごとに 2 つの方向で示しています。P5 の配列は、テーブルのカラムヘッドを注意深く確認してください。

最初の P5 インデックスの方向は NovaSeq 6000 v1.0 ケミストリ、MiSeq および HiSeq 2500 に対応しています。本マニュアルではサポートしていませんが HiSeq 2000 プラットフォームにも対応した方向です。

2 番目の P5 インデックスの方向は NovaSeq 6000 v1.5 ケミストリ、NextSeq 500/550、HiSeq 4000 および HiSeq 3000 に対応しています。本マニュアルではサポートしていませんが iSeq 100、MiniSeq および HiSeq X にも対応した方向です。

各プライマーペアは、1 回分の液量が 96 ウェルプレートウェルに分注されています。プレートマップ 82~83 ページをご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは、1 回分の液量を含みます。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、各ウェルはライブラリ調製反応 1 回のみ使用してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

7. リファレンス

表 51 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 1 ~ 48 (オレンジ色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
1	A01	CAAGGTGA	ATGGTTAG	CTAACCAT	25	A04	AGATGGAT	TGGCACCA	TGGTGCCA
2	B01	TAGACCAA	CAAGGTGA	TCACCTTG	26	B04	GAATTGTG	AGATGGAT	ATCCATCT
3	C01	AGTCGCGA	TAGACCAA	TTGGTCTA	27	C04	GAGCACTG	GAATTGTG	CACAATTC
4	D01	CGGTAGAG	AGTCGCGA	TCGCGACT	28	D04	GTTGCGGA	GAGCACTG	CAGTGCTC
5	E01	TCAGCATC	AAGGAGCG	CGCTCCTT	29	E04	AATGGAAC	GTTGCGGA	TCCGCAAC
6	F01	AGAAGCAA	TCAGCATC	GATGCTGA	30	F04	TCAGAGGT	AATGGAAC	GTTCCATT
7	G01	GCAGGTTC	AGAAGCAA	TTGCTTCT	31	G04	GCAACAAT	TCAGAGGT	ACCTCTGA
8	H01	AAGTGTCT	GCAGGTTC	GAACCTGC	32	H04	GTCGATCG	GCAACAAT	ATTGTTGC
9	A02	CTACCGAA	AAGTGTCT	AGACACTT	33	A05	ATGGTAGC	GTCGATCG	CGATCGAC
10	B02	TAGAGCTC	CTACCGAA	TTCGGTAG	34	B05	CGCCAATT	ATGGTAGC	GCTACCAT
11	C02	ATGTCAAG	TAGAGCTC	GAGCTCTA	35	C05	GACAATTG	CGCCAATT	AATTGGCG
12	D02	GCATCATA	ATGTCAAG	CTTGACAT	36	D05	ATATTCCG	GACAATTG	CAATTGTC
13	E02	GACTTGAC	GCATCATA	TATGATGC	37	E05	TCTACCTC	ATATTCCG	CGGAATAT
14	F02	CTACAATG	GACTTGAC	GTCAAGTC	38	F05	TCGTCGTG	TCTACCTC	GAGGTAGA
15	G02	TCTCAGCA	CTACAATG	CATTGTAG	39	G05	ATGAGAAC	TCGTCGTG	CACGACGA
16	H02	AGACACAC	TCTCAGCA	TGCTGAGA	40	H05	GTCCTATA	ATGAGAAC	GTTCTCAT
17	A03	CAGGTCTG	AGACACAC	GTGTGTCT	41	A06	AATGACCA	GTCCTATA	TATAGGAC
18	B03	AATACGCG	CAGGTCTG	CAGACCTG	42	B06	CAGACGCT	AATGACCA	TGGTCATT
19	C03	GCACACAT	AATACGCG	CGCGTATT	43	C06	TCGAACTG	CAGACGCT	AGCGTCTG
20	D03	CTTGCATA	GCACACAT	ATGTGTGC	44	D06	CGCTTCCA	TCGAACTG	CAGTTCGA
21	E03	ATCCTCTT	CTTGCATA	TATGCAAG	45	E06	TATTCCTG	CGCTTCCA	TGGAAGCG
22	F03	GCACCTAA	ATCCTCTT	AAGAGGAT	46	F06	CAAGTTAC	TATTCCTG	CAGGAATA
23	G03	TGCTGCTC	GCACCTAA	TTAGGTGC	47	G06	CAGAGCAG	CAAGTTAC	GTAAGTTG
24	H03	TGGCACCA	TGCTGCTC	GAGCAGCA	48	H06	CGCGCAAT	CAGAGCAG	CTGCTCTG

表 52 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 49 ~ 96 (オレンジ色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
49	A07	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	A10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACAT
50	B07	ATGACGAA	TGAGGAGT	ACTCCTCA	74	B10	CAGTTGCG	AACGCATT	AATGCGTT
51	C07	TACGGCGA	ATGACGAA	TTCGTCAT	75	C10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D07	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	E07	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTCGCT	77	E10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	F07	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	F10	AAGAACCT	GCAATGAA	TTCAATGC
55	G07	GACTCAAT	GATCGCCT	AGGCGATC	79	G10	CTGTGCCT	AAGAACCT	AGGTTCTT
56	H07	CAGCTTGC	GACTCAAT	ATTGAGTC	80	H10	TACGTAGC	CTGTGCCT	AGGCACAG
57	A08	AGCTGAAG	CAGCTTGC	GCAAGCTG	81	A11	AAGTGGAC	TACGTAGC	GCTACGTA
58	B08	ATTCCGTG	AGCTGAAG	CTTCAGCT	82	B11	CAACCGTG	AAGTGGAC	GTCCACTT
59	C08	TATGCCGC	ATTCCGTG	CACGGAAT	83	C11	CTGTTGTT	CAACCGTG	CACGGTTG
60	D08	TCAGCTCA	TATGCCGC	GCGGCATA	84	D11	GCACGATG	CTGTTGTT	AACAACAG
61	E08	AACTGCAA	TCAGCTCA	TGAGCTGA	85	E11	GTACGGAC	GCACGATG	CATCGTGC
62	F08	ATTAGGAG	AACTGCAA	TTGCAGTT	86	F11	CTCCAAGC	GTACGGAC	GTCCGTAC
63	G08	CAGCAATA	ATTAGGAG	CTCCTAAT	87	G11	TAGTCTGA	CTCCAAGC	GCTTGGAG
64	H08	GCCAAGCT	CAGCAATA	TATTGCTG	88	H11	TTCGCCGT	TAGTCTGA	TCAGACTA
65	A09	TCCGTAA	GCCAAGCT	AGCTTGGC	89	A12	GAACTAAG	ATACGAAG	CTTCGTAT
66	B09	GTGCAACG	TCCGTAA	TTAACGGA	90	B12	AAGCCATC	GAGATTCA	TGAATCTC
67	C09	AGTAACGC	GTGCAACG	CGTTGCAC	91	C12	AACTCTTG	AAGCCATC	GATGGCTT
68	D09	CATAGCCA	AGTAACGC	GCGTACT	92	D12	GTAGTCAT	AACTCTTG	CAAGAGTT
69	E09	CACTAGTA	CATAGCCA	TGGCTATG	93	E12	CTCGCTAG	GTAGTCAT	ATGACTAC
70	F09	TTAGTGCG	CACTAGTA	TACTAGTG	94	F12	AGTCTTCA	CAGTATCA	TGATACTG
71	G09	TCGATACA	TTAGTGCG	CGCACTAA	95	G12	TCAAGCTA	CTTCGTAC	GTACGAAG
72	H09	ATAGTGAC	TCGATACA	TGTATCGA	96	H12	CTTATCCT	TCAAGCTA	TAGCTTGA

7. リファレンス

表 53 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 97 ~ 144 (青いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
97	A01	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	A04	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	B01	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	B04	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	C01	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGTT	123	C04	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D01	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D04	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	E01	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAACT	125	E04	CGTCAAGA	CACACATA	TATGTGTG
102	F01	GCTACGCA	GTTGGTGT	ACACCAAC	126	F04	TTCGCGCA	CGTCAAGA	TCTTGACG
103	G01	TCAACTGC	GCTACGCA	TGCGTAGC	127	G04	CGACTACG	TTCGCGCA	TGCGCGAA
104	H01	AAGCGAAT	TCAACTGC	GCAGTTGA	128	H04	GAAGGTAT	CGACTACG	CGTAGTCG
105	A02	GTGTTACA	AAGCGAAT	ATTCGCTT	129	A05	TTGGCATG	GAAGGTAT	ATACCTTC
106	B02	CAAGCCAT	GTGTTACA	TGTAACAC	130	B05	CGAATTCA	TTGGCATG	CATGCCAA
107	C02	CTCTCGTG	CAAGCCAT	ATGGCTTG	131	C05	TTAGTTGC	CGAATTCA	TGAATTGC
108	D02	TCGACAAC	CTCTCGTG	CACGAGAG	132	D05	GATGCCAA	TTAGTTGC	GCAACTAA
109	E02	TCGATGTT	TCGACAAC	GTTGTCGA	133	E05	AGTTGCCG	GATGCCAA	TTGGCATC
110	F02	CAAGGAAG	TCGATGTT	AACATCGA	134	F05	GTCCACCT	AGTTGCCG	CGGCAACT
111	G02	ATTGATGC	AGAGAATC	GATTCTCT	135	G05	ATCAAGGT	GTCCACCT	AGGTGGAC
112	H02	TCGCAGAT	TTGATGGC	GCCATCAA	136	H05	GAACCAGA	ATCAAGGT	ACCTTGAT
113	A03	GCAGAGAC	TCGCAGAT	ATCTGCGA	137	A06	CATGTTCT	GAACCAGA	TCTGGTTC
114	B03	CTGCGAGA	GCAGAGAC	GTCTCTGC	138	B06	TCACTGTG	CATGTTCT	AGAACATG
115	C03	CAACCAAC	CTGCGAGA	TCTCGCAG	139	C06	ATTGAGCT	TCACTGTG	CACAGTGA
116	D03	ATCATGCG	CAACCAAC	GTTGGTTG	140	D06	GATAGAGA	ATTGAGCT	AGCTCAAT
117	E03	TCTGAGTC	ATCATGCG	CGCATGAT	141	E06	TCTAGAGC	GATAGAGA	TCTCTATC
118	F03	TCGCCTGT	TCTGAGTC	GACTCAGA	142	F06	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	G03	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCGA	143	G06	CTTCACGT	GAATCGCA	TGCGATTG
120	H03	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	H06	CTCCGGTT	CTTCACGT	ACGTGAAG

表 54 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 145 ~ 192 (青いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
145	A07	TGTGACTA	CTCCGGTT	AACCGGAG	169	A10	CGCTCAGA	CTAACAAG	CTTGTTAG
146	B07	GCTTCCAG	TGTGACTA	TAGTCACA	170	B10	TAACGACA	CGCTCAGA	TCTGAGCG
147	C07	CATCCTGT	GCTTCCAG	CTGGAAGC	171	C10	CATACTTG	TAACGACA	TGTCGTTA
148	D07	GTAATACG	CATCCTGT	ACAGGATG	172	D10	AGATACGA	CATACTTG	CAAGTATG
149	E07	GCCAACAA	GTAATACG	CGTATTAC	173	E10	AATCCGAC	AGATACGA	TCGTATCT
150	F07	CATGACAC	GCCAACAA	TTGTTGGC	174	F10	TGAAGTAC	AATCCGAC	GTCGGATT
151	G07	TGCAATGC	CATGACAC	GTGTCATG	175	G10	CGAATCAT	TGAAGTAC	GTACTTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTCG
153	A08	CAATCCGA	CACATTCG	CGAATGTG	177	A11	TCGAAGGA	TGATTGGC	GCCAATCA
154	B08	CATCGACG	CAATCCGA	TCGGATTG	178	B11	CAGTCATT	TCGAAGGA	TCCTTCGA
155	C08	GTGCGCTT	CATCGACG	CGTCGATG	179	C11	CGCGAACA	CAGTCATT	AATGACTG
156	D08	ATAGCGTT	GTGCGCTT	AAGCGCAC	180	D11	TACGGTTG	CGCGAACA	TGTTGCGG
157	E08	GAGTAAGA	ATAGCGTT	AACGCTAT	181	E11	AGAACCGT	TACGGTTG	CAACCGTA
158	F08	CTGACACA	GAGTAAGA	TCTTACTC	182	F11	AGGTGCTT	AGAACCGT	ACGGTTCT
159	G08	ATACGTGT	CTGACACA	TGTGTCAG	183	G11	ATCGCAAC	AGGTGCTT	AAGCACCT
160	H08	GACCGAGT	ATACGTGT	ACACGTAT	184	H11	GCCTCTCA	ATCGCAAC	GTTGCGAT
161	A09	GCAGTTAG	GACCGAGT	ACTCGGTC	185	A12	TCGCGTCA	GCCTCTCA	TGAGAGGC
162	B09	CGTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	B12	GAGTGCCT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	C09	CGTTAACG	CGTTCGTC	GACGAACG	187	C12	CGAACACT	GCATAAGT	ACTTATGC
164	D09	TCGAGCAT	CGTTAACG	CGTTAACG	188	D12	TAAGAGTG	AGAAGACG	CGTCTTCT
165	E09	GCCGTAAC	TCGAGCAT	ATGCTCGA	189	E12	TGGATTGA	TAAGAGTG	CACTCTTA
166	F09	GAGCTGTA	GCCGTAAC	GTTACGGC	190	F12	AGGACATA	TGGATTGA	TCAATCCA
167	G09	AGGAAGAT	GAGCTGTA	TACAGCTC	191	G12	GACATCCT	AGGACATA	TATGTCCT
168	H09	CTAACAAG	AGGAAGAT	ATCTTCCT	192	H12	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

7. リファレンス

表 55 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 193 ~ 240 (緑色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
193	A01	GTCTCTTC	GAAGCCTC	GAGGCTTC	217	A04	GCGGTATG	CACGAGCT	AGCTCGTG
194	B01	AGTCACTT	GTCTCTTC	GAAGAGAC	218	B04	TCTATGCG	GCGGTATG	CATACCGC
195	C01	AGCATACA	AGTCACTT	AAGTGACT	219	C04	AGGTGAGA	TCTATGCG	CGCATAGA
196	D01	TCAGACAA	AGCATACA	TGTATGCT	220	D04	CACAACTT	AGGTGAGA	TCTCACCT
197	E01	TTGGAGAA	TCAGACAA	TTGTCTGA	221	E04	TTGTGTAC	CACAACTT	AAGTTGTG
198	F01	TTAACGTG	TTGGAGAA	TTCTCCAA	222	F04	TCACAAGA	TTGTGTAC	GTACACAA
199	G01	CGTCTGTG	TTAACGTG	CACGTTAA	223	G04	GAAGACCT	TCACAAGA	TCTGTGTA
200	H01	AACCTAAC	CGTCTGTG	CACAGACG	224	H04	AGTTCTGT	GAAGACCT	AGGTCTTC
201	A02	AGAGTGCT	AACCTAAC	GTTAGGTT	225	A05	GCAGTGTT	AGTTCTGT	ACAGAACT
202	B02	TTATCTCG	AGAGTGCT	AGCACTCT	226	B05	AGGCATGC	GCAGTGTT	AACACTGC
203	C02	CATCAGTC	TTATCTCG	CGAGATAA	227	C05	AAGGTACT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GACTGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTACT	AGTACCTT
205	E02	CAGTGAGC	AAGCACAA	TTGTGCTT	229	E05	GAGTCCTA	CACTAAGT	ACTTAGTG
206	F02	GTCGAAGT	CAGTGAGC	GCTCACTG	230	F05	AGTCCTTC	GAGTCCTA	TAGGACTC
207	G02	TCTCATGC	GTCGAAGT	ACTTCGAC	231	G05	TTAGGAAC	AGTCCTTC	GAAGGACT
208	H02	CAGAAGAA	TCTCATGC	GCATGAGA	232	H05	AAGTCCAT	TTAGGAAC	GTTCTTAA
209	A03	CGGATAGT	CAGAAGAA	TTCTTCTG	233	A06	GAATACGC	AAGTCCAT	ATGGACTT
210	B03	CACGTGAG	CGGATAGT	ACTATCCG	234	B06	TCCAATCA	GAATACGC	GCGTATTC
211	C03	TACGATAC	CACGTGAG	CTCACGTG	235	C06	CGACGGTA	TCCAATCA	TGATTGGA
212	D03	CGCATGCT	TACGATAC	GTATCGTA	236	D06	CATTGCAT	CGACGGTA	TACCGTCG
213	E03	GCTTGCTA	CGCATGCT	AGCATGCG	237	E06	ATCTGCGT	CATTGCAT	ATGCAATG
214	F03	GAACGCAA	GCTTGCTA	TAGCAAGC	238	F06	GTACCTTG	ATCTGCGT	ACGCAGAT
215	G03	ATCTACCA	GAACGCAA	TTGCGTTC	239	G06	GAGCATAC	GTACCTTG	CAAGGTAC
216	H03	CACGAGCT	ATCTACCA	TGGTAGAT	240	H06	TGCTTACG	GAGCATAC	GTATGCTC

表 56 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 241~288 (緑色のプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
241	A07	AAGAGACA	TGCTTACG	CGTAAGCA	265	A10	CAATGCTG	CATGAATG	CATTCATG
242	B07	TAGCTATG	AAGAGACA	TGTCTCTT	266	B10	CTTGATCA	CAATGCTG	CAGCATTG
243	C07	TCTGCTAC	TAGCTATG	CATAGCTA	267	C10	GCGAATTA	CTTGATCA	TGATCAAG
244	D07	GTCACAGA	TCTGCTAC	GTAGCAGA	268	D10	GTTGAGC	GCGAATTA	TAATTCGC
245	E07	CGATTGAA	GTCACAGA	TCTGTGAC	269	E10	GCCAGTAG	GTTGAGC	GCTCGAAC
246	F07	GAGAGATT	CGATTGAA	TTCAATCG	270	F10	AAGGTCGA	GCCAGTAG	CTACTGGC
247	G07	TCATACCG	GAGAGATT	AATCTCTC	271	G10	AGTGAAGT	CACCTATG	CATAAGTG
248	H07	TCCGAACT	TCATACCG	CGGTATGA	272	H10	GTTGCAAG	ATAACGGC	GCCGTTAT
249	A08	AGAGAGAA	TCCGAACT	AGTTGCGA	273	A11	AGCCGGAA	GTTGCAAG	CTTGCAAC
250	B08	GATCGTTA	AGAGAGAA	TTCTCTCT	274	B11	AACAGCCG	AGCCGGAA	TTCCGGCT
251	C08	GCGCTAGA	GATCGTTA	TAACGATC	275	C11	CTAGTGTA	AACAGCCG	CGGCTGTT
252	D08	ATGACTCG	GCGCTAGA	TCTAGCGC	276	D11	GAGGCTCT	CTAGTGTA	TACACTAG
253	E08	CAATAGAC	ATGACTCG	CGAGTCAT	277	E11	CTCCGCAA	GAGGCTCT	AGAGCCTC
254	F08	CGATATGC	CAATAGAC	GTCTATTG	278	F11	CGCTATTG	CTCCGCAA	TTGCGGAG
255	G08	GTCAGAAT	CGATATGC	GCATATCG	279	G11	GTGTTGAG	CGCTATTG	CAATAGCG
256	H08	CATAAGGT	GCACTACT	AGTAGTGC	280	H11	TCACCGAC	GTGTTGAG	CTCAACAC
257	A09	TGTTGGTT	GATTCGGC	GCCGAATC	281	A12	CGGTAATC	TCACCGAC	GTCGGTGA
258	B09	ATACTCGC	TGTTGGTT	AACCAACA	282	B12	GTGACTGC	CGGTAATC	GATTACCG
259	C09	AATGCTAG	ATACTCGC	GCGAGTAT	283	C12	CGACTTGT	GTGACTGC	GCAGTCAC
260	D09	GCCTAGGA	AATGCTAG	CTAGCATT	284	D12	GATAGGAC	CGACTTGT	ACAAGTCG
261	E09	GCAACCGA	GCCTAGGA	TCCTAGGC	285	E12	AAGTACTC	GATAGGAC	GTCCTATC
262	F09	ATACTGCA	GCAACCGA	TCGGTTGC	286	F12	GCTCTCTC	AAGTACTC	GAGTACTT
263	G09	TCTCCTTG	ATACTGCA	TGCAGTAT	287	G12	CTACCAGT	GCTCTCTC	GAGAGAGC
264	H09	CATGAATG	TCTCCTTG	CAAGGAGA	288	H12	GATGAGAT	CTACCAGT	ACTGGTAG

7. リファレンス

表 57 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 289 ~ 336 (赤いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
289	A01	AGATAGTG	GATGAGAT	ATCTCATC	313	A04	AGCTACAT	GATCCATG	CATGGATC
290	B01	AGAGGTTA	AGATAGTG	CACTATCT	314	B04	CGCTGTAA	AGCTACAT	ATGTAGCT
291	C01	CTGACCGT	AGAGGTTA	TAACCTCT	315	C04	CACTACCG	CGCTGTAA	TTACAGCG
292	D01	GCATGGAG	CTGACCGT	ACGGTCAG	316	D04	GCTCACGA	CACTACCG	CGGTAGTG
293	E01	CTGCCTTA	GCATGGAG	CTCCATGC	317	E04	TGGCTTAG	GCTCACGA	TCGTGAGC
294	F01	GCGTCACT	CTGCCTTA	TAAGGCAG	318	F04	TCCAGACG	TGGCTTAG	CTAAGCCA
295	G01	GCGATTAC	GCGTCACT	AGTGACGC	319	G04	AGTGGCAT	TCCAGACG	CGTCTGGA
296	H01	TCACCACG	GCGATTAC	GTAATCGC	320	H04	TGTACCGA	AGTGGCAT	ATGCCACT
297	A02	AGACCTGA	TCACCACG	CGTGGTGA	321	A05	AAGACTAC	TGTACCGA	TCGGTACA
298	B02	GCCGATAT	AGACCTGA	TCAGGTCT	322	B05	TGCCGTTA	AAGACTAC	GTAGTCTT
299	C02	CTTATTGC	GCCGATAT	ATATCGGC	323	C05	TTGGATCT	TGCCGTTA	TAACGGCA
300	D02	CGATACCT	CTTATTGC	GCAATAAG	324	D05	TCCTCCAA	TTGGATCT	AGATCCAA
301	E02	CTCGACAT	CGATACCT	AGGTATCG	325	E05	CGAGTCGA	TCCTCCAA	TTGGAGGA
302	F02	GAGATCGC	CTCGACAT	ATGTGCGAG	326	F05	AGGCTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGCTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAACTCAC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAACTCAC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GA CTGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GA CTGACG	CGTCAGTC	331	C06	AACTCACA	TGGAGACT	AGTCTCCA
308	D03	GAGTGTAG	CTTAAGAC	GTCTTAAG	332	D06	GTAGACTG	AACTCACA	TGTGAGTT
309	E03	TGCACATC	GAGTGTAG	CTACACTC	333	E06	CGTAGTTA	GTAGACTG	CAGTCTAC
310	F03	CGATGTCG	TGCACATC	GATGTGCA	334	F06	CGTCAGAT	CGTAGTTA	TAACTACG
311	G03	AACACCGA	CGATGTCG	CGACATCG	335	G06	AACGGTCA	CGTCAGAT	ATCTGACG
312	H03	GATCCATG	AACACCGA	TCGGTGTT	336	H06	GCCTTCAT	AACGGTCA	TGACCGTT

表 58 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア配列 337 ~ 384 (赤いプレート)

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
337	A07	TGAGACGC	GCCTTCAT	ATGAAGGC	361	A10	CTGAGCTA	GCACAGTA	TACTGTGC
338	B07	CATCGGAA	TGAGACGC	GCGTCTCA	362	B10	CTTGCGAT	CTGAGCTA	TAGCTCAG
339	C07	TAGGACAT	CATCGGAA	TTCCGATG	363	C10	GAAGTAGT	CTTGCGAT	ATCGCAAG
340	D07	AACACAAG	TAGGACAT	ATGTCCTA	364	D10	GTTATCGA	GAAGTAGT	ACTACTTC
341	E07	TTCGACTC	AACACAAG	CTTGTGTT	365	E10	TGTCGTCG	GTTATCGA	TCGATAAC
342	F07	GTCGGTAA	TTCGACTC	GAGTCGAA	366	F10	CGTAACTG	TGTCGTCG	CGACGACA
343	G07	GTTCAATC	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCAATC	GAATGAAC	368	H10	TCGTACAC	GCATGCCT	AGGCATGC
345	A08	ATAAGCTG	AAGCAGTT	AACTGCTT	369	A11	CACAGGTG	TCGTACAC	GTGTACGA
346	B08	GCTTAGCG	ATAAGCTG	CAGCTTAT	370	B11	AGCAGTGA	CACAGGTG	CACCTGTG
347	C08	TTCCAACA	GCTTAGCG	CGCTAAGC	371	C11	ATTCCAGA	AGCAGTGA	TCACTGCT
348	D08	TACCGCAT	TTCCAACA	TGTTGGAA	372	D11	TCCTTGAG	ATTCCAGA	TCTGGAAT
349	E08	AGGCAATG	TACCGCAT	ATGCGGTA	373	E11	ATACCTAC	TCCTTGAG	CTCAAGGA
350	F08	GCCTCGTT	AGGCAATG	CATTGCCT	374	F11	AGACCATT	ATACCTAC	GTAGGTAT
351	G08	CACGGATC	GCCTCGTT	AACGAGGC	375	G11	CGTAAGCA	AGACCATT	AATGGTCT
352	H08	GAGACACG	CACGGATC	GATCCGTG	376	H11	TCTGTCAG	CGTAAGCA	TGCTTACG
353	A09	AGAGTAAG	GAGACACG	CGTGTCTC	377	A12	CACAGACT	TCTGTCAG	CTGACAGA
354	B09	AGTACGTT	AGAGTAAG	CTTACTCT	378	B12	GTCGCCTA	CACAGACT	AGTCTGTG
355	C09	AACGCTGC	AGTACGTT	AACGTAAT	379	C12	TGCGCTCT	GTCGCCTA	TAGGCGAC
356	D09	GTAGAGCA	AACGCTGC	GCAGCGTT	380	D12	GCTATAAG	TGCGCTCT	AGAGCGCA
357	E09	TCCTGAGA	GTAGAGCA	TGCTCTAC	381	E12	CAACAAC	GCTATAAG	CTTATAGC
358	F09	CTGAATAG	TCCTGAGA	TCTCAGGA	382	F12	AGAGAATC	CTCTCACT	AGTGAGAG
359	G09	CAAGACTA	CTGAATAG	CTATTCAG	383	G12	TAATGGTC	AGACGAGC	GCTCGTCT
360	H09	GCACAGTA	CAAGACTA	TAGTCTTG	384	H12	GTTGTATC	TAATGGTC	GACCATTA

7. リファレンス

インデックスプライマーペアのプレートマップ

表 59 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1~96 (オレンジ色のプレート)のプレートマップ

	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 60 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97~192 (青いプレート)のプレートマップ

	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

表 61 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193~288 (緑色のプレート)の
プレートマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
B	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
C	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
D	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
E	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
F	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286
G	199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279	287
H	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288

表 62 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289~384 (赤いプレート)の
プレートマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
B	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
C	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
D	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
E	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
F	294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374	382
G	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375	383
H	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376	384

7. リファレンス

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

キャプチャ前のライブラリの収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペティング・混合の特異的な説明が記載されています。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ 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（24 ページ参照）。
- ✓ 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、33 ページ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。37 ページの図 4 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 27 ページ 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

7. リファレンス

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）のためには、アダプターダイマーピークが存在するサンプルは、追加で SPRI 精製の実施を推奨します。その際は、サンプルを Nuclease-free water で 50 ul に希釈して、33 ページに記載されている 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。
- ✓ ハイブリダイゼーションに使用した RNA プローブに要因がある可能性があります。使用したキャプチャプローブのチューブや 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、44 ページの内容にて、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、53 ページ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（47 ページ参照）
 - 洗浄中はサンプルが 70 °C で保たれていること（48 ページ参照）
 - 洗浄中は、ピペティングとボルテックスミキサーでビーズが均一な状態に混合されていること（48 ページ参照）
- ✓ 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（45 ページのステップ 7 と 8）でサンプルの温度

を 65 °C に保てるように、ボルテックスとチューブやプレートのスピンド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。
- SureSelect XT HS PreCap Human All Exon V8 プローブを使用し、42 ページ表 28 のハイブリダイゼーションプログラム (65 °C 1 時間のインキュベーションを含む) でターゲットエンリッチしたライブラリは、42 ページ表 29 のハイブリダイゼーションプログラム (65 °C 1 時間のインキュベーションを含まない) でターゲットエンリッチメントを行ってください。
- 他のキャプチャプローブは、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 (42 ページ表 29 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。
- ✓ SureDesign で、ターゲットエンリッチメントプローブを XT HS ブースティングのパラメータで再デザインしてください。

7. リファレンス

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 15 ~ 57 ページ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 Low TE (50 µl for Covaris/7 µl for enzymatic fragmentation) For FFPE DNA, qualify integrity and adjust input amount as directed on p. 16 and p. 16 Mechanically shear DNA using Covaris with shearing conditions on p. 17 OR enzymatically fragment DNA using SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit with protocol on p. 19 50-µl ブックマーク (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 が定義されていません。
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 DNA fragments	50 µl DNA fragments + 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 SureSelect XT HS2 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 ₂ O, removing 34 µl to fresh well
Prepare PCR master mix	Per reaction: 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the purified DNA	34 µl purified DNA + 11 µl PCR master mix + 5 µl assigned SureSelect XT HS2 Index Primer Pair Amplify in thermal cycler using program on p. 30
Purify amplified DNA	50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 15 µl nuclease-free H ₂ O
Quantify and qualify DNA	Analyze quantity and quality using TapeStation, Bioanalyzer, or Fragment Analyzer System

Step	Summary of Conditions
Hybridization/Capture	
Prep DNA in hyb plate	Pool equal amounts of indexed libraries for total of 1.5 or 3 µg library DNA per pool (see p. 40). Adjust volume to 12 µl with nuclease-free H ₂ O (and using vacuum concentrator where needed).
Program thermal cycler	Input the appropriate thermal cycler program on p. 42 and pause program
Run pre-hybridization blocking protocol	12 µl library DNA pool + 5 µl SureSelect XT HS2 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 Probe Hyb Mix 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 ₂ O + 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 the remaining hybridization segment(s) and 65°C or 21°C hold segment
Prepare streptavidin beads	Wash 50 µl 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 (1400-1900 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 ₂ O
Post-capture amplification	
Prepare PCR master mix	Per reaction: 13 µl nuclease-free H ₂ O+ 10 µl 5× Herculanase II Reaction Buffer with dNTPs + 1 µl SureSelect Post-Capture Primer Mix + 1 µl Herculanase 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 p. 51
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 Low TE
Quantify and qualify DNA	Analyze quantity and quality using TapeStation, Bioanalyzer, or Fragment Analyzer System

G220429

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。