



SureSelect XT HS2 DNA キット

ライブラリ調製（MBC 付き/MBC なし） / Fast-Hyb ターゲットエンリッチメント /
ポストキャプチャプーリングワークフロー
イルミナ NGS プラットフォーム対応

和文プロトコル

Protocol Version F0, May 2023 対応
[2024 年 4 月版 和文]

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

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2023

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。

CAUTION

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

WARNING

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

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、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 Kits

Library Preparation (+/-MBC) / Fast-Hyb Target Enrichment / Post-capture Pooling Workflow

For Illumina Platform NGS

Version F0, May 2023 [G9983-90000] に対応しています。

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](mailto:japan@agilent.com)

本資料は、SureSelect XT HS2 DNA Reagent キットを使用して、イルミナ社のターゲットエンリッチしたペアエンドマルチプレックスシーケンシングライブラリを作製するためのプロトコルです。本資料が提供する具体的なワークフローは、Fast-Hyb ターゲットエンリッチメントおよびポストキャプチャライブラリプーリングを用いたライブラリ調製（デュアル分子バーコードまたは分子バーコードの有無）を含みます。

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. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

この章では、分子バーコード (MBC) 付きアダプターまたは MBC なしのアダプターを用いて、デュアルインデックスを付加した 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、キャプチャおよび増幅

この章では、調製した DNA ライブラリから SureSelect プローブを用いてターゲット断片をハイブリダイズしキャプチャする手順を説明しています。標準の SureSelect XT HS2 試薬を使用したファストハイブリダイゼーション（2～3 時間）です。ポストキャプチャライブラリの増幅から最終的なライブラリ QC ステップまでこの章に含まれます。

5. NGS および解析のガイドライン

この章では、キャプチャ後サンプルのプーリングと続く NGS サンプル準備から解析まで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。

Version F0 での追加項目

- ・ 新しい SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット（分子バーコードなし）に対応しました。12 ページの表 2 をご覧ください。キットの構成は 70 ページの表 51 および 71 ページの表 53、ライブラリ調製手順は 26 ページ以降をご覧ください。NGS サポート関連は 58～63 ページにあります。
- ・ 9 ページの図 1 および表 1 をアップデートしました。
- ・ SureSelect XT HS2 DNA 試薬キットの使用オプションを 12 ページ表 2 にまとめました。
- ・ SureSelect XT HS Clinical Research Exome V4 （13 ページ表 3 および 42 ページ表 29）に対応しました。
- ・ 本ワークフローに対応したプローブリストをアップデートしました（13 ページ表 3）。表 3 に載っていない SureSelect XT プローブは、推奨されているオーバーナイトハイブリダイゼーションの手順（G9956-90000）をご覧ください。
- ・ 対応するランサイズに適切な試薬量を明記した 14 ページ表 4 をアップデートしました。
- ・ サーマルサイクラの推奨に従い、推奨するチューブキャップストリップをドーム型キャップからフラットまたはドーム型キャップにアップデートしました（14 ページ表 5 および 24 ページ表 14）。
- ・ 同時に処理するサンプルに関する注意事項を Note に記載しました（18 ページ）。
- ・ 21 ページのコバリスのセットアップ手順をアップデートしました。
- ・ 「MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製」の章の書式と文章を更新しました。いずれの更新も、MBC を含む SureSelect XT HS2 ライブラリすなわち「MBC 付きの」ライブラリの調製プロトコルの重要な変更に伴うものではありません。
- ・ SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix を希釈した後、MBC なしの RNA ライブラリを調製するための、新しい SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット（分子バーコードなし）を使用する内容をサポートします（27 ページ）。
- ・ 「ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅」の章の書式と文章を更新し、キャプチャ後 PCR および QC ステップをこの章に含めました。いずれの更新も、SureSelect XT HS2 DNA ターゲットエンリッチメントやキャプチャ後増幅のプロトコルの重要な変更に関連するものではありません。
- ・ シーケンス後のサポート情報を更新しました。
- ・ 試薬キットの構成品の記載を再編成しました。
- ・ AMPure XP 精製ステップでの回収率を最大化する考察を含むトラブルシューティングの更新をしました。
- ・ 8 サンプルまたは 24 サンプル用の試薬混合量を含めるようクイックリファレンスを更新しました。
- ・ 旧バージョンの「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」の章に代わる新しい「NGS および解析ガイドライン」の章を含む、新しい表紙及び形式に変更しました。

- ・ 「通知」を更新しました。

Version D0 までの追加項目

- ・ 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やハイブリダイゼーションプログラム、トラブルシュートガイド、クイックリファレンスなどを更新しました。
- ・ DNA やライブラリの解析プラットフォームに FragmentAnalyzer を追加し、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。
- ・ イルミナ社のキット選択ガイドラインを更新しました。
- ・ 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。

内容

1. はじめに	8
ワークフロー概要	9
操作および安全に関する注意	11
SureSelect XT HS2 DNA キットおよび対応するワークフロー	12
追加で必要な試薬・器具	13
オプションの器具・試薬	17
2. インプット DNA の準備と断片化	18
Step 1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認	19
新鮮なサンプル由来の質の高い gDNA の場合	19
FFPE サンプル由来の gDNA の調製と品質確認	19
Step 2. DNA の断片化	21
方法 1: コバリスを用いた DNA 断片化	21
方法 2: 酵素による断片化	23
3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製	26
Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製	28
Step 2. DNA 3' 端の末端修復および dA 付加	28
Step 3. アダプターのライゲーション	30
Step 4. AMPure XP ビーズを使用したライブラリの精製	31
Step 5. プレキャプチャライブラリの増幅とインデックス付加	32
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製	35

Step 7. プレキャプチャライブラリの QC と定量	36
4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅	40
Step 1. ライブラリを SureSelect プローブへハイブリダイズする	42
Step 2. キャプチャに使用するストレプトアビジンビーズの調製	45
Step 3. ハイブリダイズしたライブラリのキャプチャ	46
Step 4. キャプチャしたライブラリの増幅	47
Step 5. AMPure XP ビーズを使用した最終ライブラリの精製	49
Step 6. 最終ライブラリの QC および定量	51
5. NGS および解析のガイドライン	55
Step 1. マルチプレックスシーケンスのためサンプルのプール	56
Step 2. シーケンスサンプルの調製	58
Step 3. ライブラリのシーケンス	59
Step 4. リード処理と解析	60
6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用	65
FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更	66
FFPE サンプルの品質確認	66
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	66
7. リファレンス	68
Reagent Kit に含まれている試薬	69
MBC 付きライブラリ調製の試薬キット	69
MBC なしのライブラリ調製試薬キット	70
各キットの内容	70
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報	72
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの配列	73
ストリップチューブおよびプレートのインデックスプライマーペアの位置	81
トラブルシュートガイド	84
クイックリファレンス	89

1. はじめに

1. はじめに

ワークフロー概要 9

操作および安全に関する注意 11

SureSelect XT HS2 DNA キットおよび対応するワークフロー 12

追加に必要な試薬・器具 13

オプションの器具・試薬 17

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

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シーケンスのマニュアルや他の SureSelect プロトコルと異なるステップがあります。ライブラリ調製時に使用する専用のアダプターオリゴミックスや、ターゲットエンリッチメントで使用する専用のブロッキングやハイブリダイゼーションの試薬を使用することにご注意ください。

NOTE

本プロトコルに記載されている SureSelect 試薬を使用したときのみ、保証および技術的なサポートの対象となります。

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。

ワークフロー概要

SureSelect XT HS2 DNA のワークフローを図 1 に示します。各ステップに要する時間は

表 1 にまとめられています。

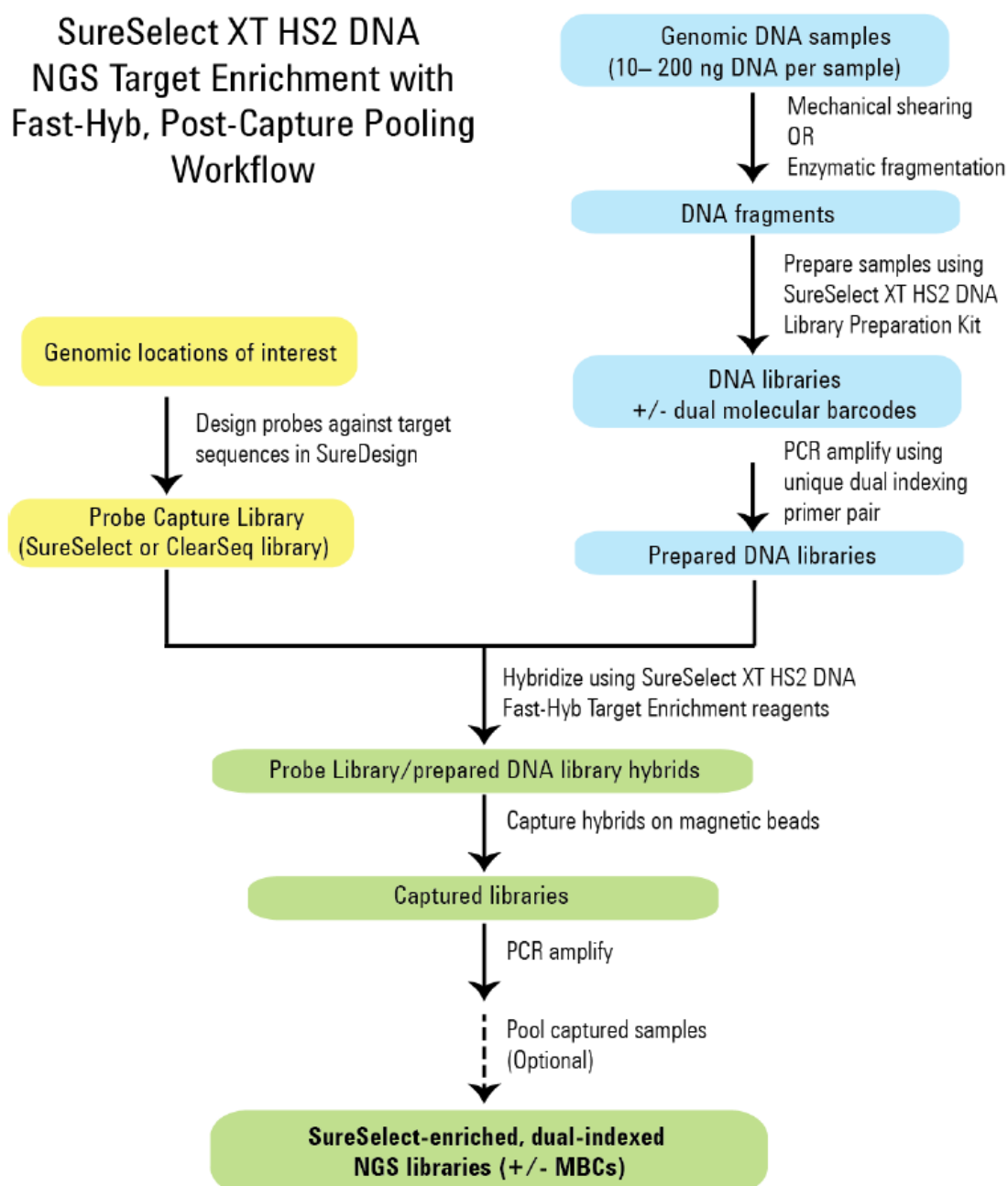


図 1 ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー

1. はじめに

表 1 各ステップの所要時間※（16 サンプルまでの場合）

ステップ	時間
断片化、ライブラリ調製および精製	2.25 時間
プレキャプチャ増幅および精製、TapeStation による QC	1.5 時間
ハイブリダイゼーションとキャプチャ	2.5 ~ 3.5 時間（2 日間のワークフローでは 16 時間オプション）
キャプチャ後の増幅および精製、TapeStation による QC	1.5 時間

※質の高いインプット DNA 200 ng を用いて 16 サンプル、酵素による DNA 断片化、>5 Mb のプローブデザインの場合の想定時間です。変動する可能性があります。

操作および安全に関する注意

- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物や核酸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。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。
- ・ SureSelect XT HS2 プロトコルで使用する試薬にはとても粘性が高いものがあります。プロトコルで示されている方法で混合するようにしてください。
- ・ 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 (BL1) 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 4 °C または -20 °C で保存できます。サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。

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

SureSelect XT HS2 DNA キットおよび対応するワークフロー

SureSelect XT HS2 DNA キットは複数のワークフローに対応した様々なキット構成となっています。本書では、SureSelect XT HS2 DNA ライブラリの調製（デュアル分子バーコードまたは分子バーコードの有無）および Fast-Hyb ターゲットエンリッチメントおよびポストプールでのキャプチャライブラリを含むワークフローに最適化したプロトコルです。

実験デザインに必要な試薬を決定するために、表 2 から最適な SureSelect XT HS2 DNA キットを選びます。ライブラリ調製およびターゲットエンリッチメント試薬の両方を含むようにしてください。次に、本ワークフローでの使用を推奨された SureSelect XT HS プローブを表 3 から選択します。

表 3 に記載されていない SureSelect XT プローブを用いて SureSelect XT HS2 ライブラリのターゲットエンリッチメントを行う場合は、推奨ワークフロー G9956-90000 をご覧ください。

表 2 SureSelect XT HS2 DNA キットのオーダー情報

✓：含まれています。 ×：含まれていません。

Agilent Part Number (Index Pairs Supplied in Kit)	Samples Processed	Library Prep Kit (Adaptor Type)	Target Enrichment Kit (Supported Workflow)	Capture Beads, Purification Beads	Enzymatic DNA Fragmentation Kit
Complete SureSelect XT HS2 DNA Starter Kit for MBC-tagged Libraries (16 Samples)					
G9982A (Index 1–16)	16*	✓ (MBC-tagged)	✓ (Fast-Hyb, Post-Cap Pool)	✓ Capture Beads ✓ Purification Beads	✓
SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits for MBC-tagged Libraries with AMPure® XP† & Streptavidin Beads (96 Samples)					
G9984A (Index 1–96) G9984B (Index 97–192) G9984C (Index 193–288) G9984D (Index 289–384)	96‡	✓ (MBC-tagged)	✓ (Fast-Hyb, Post-Cap Pool)	✓ Capture Beads ✓ Purification Beads	Optional 16 ページの表 6 参照
SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits for MBC-tagged Libraries					
G9981A (Index 1–16)	16*	✓ (MBC-tagged)	✓ (Fast-Hyb, Post-Cap Pool)	✗ 14 ページの表 4 参照	Optional 16 ページの表 6 参照
G9983A (Index 1–96) G9983B (Index 97–192) G9983C (Index 193–288) G9983D (Index 289–384)	96‡	✓ (MBC-tagged)	✓ (Fast-Hyb, Post-Cap Pool)	✗ 14 ページの表 4 参照	Optional 16 ページの表 6 参照
SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kits for MBC-free Libraries (Target Enrichment Kit purchased separately)					
G9956A (Index 1–96) G9956B (Index 97–192) G9956C (Index 193–288) G9956D (Index 289–384)	96‡	✓ (MBC-Free)	✗ (order G9987B, below)	✗ 14 ページの表 4 参照	Optional 16 ページの表 6 参照
SureSelect XT HS2 Fast-Hyb Target Enrichment Kit (Library Preparation Kit purchased separately)					
G9987B	96‡	✗ (order one of G9956A–D, above)	✓ (Fast-Hyb, Post-Cap Pool)	✓ Capture Beads ✗ Purification Beads 14 ページの表 4 参照	Not applicable

*16 反応キットには、1 ランあたりに 8 サンプルを含めた場合の 2 ラン分に相当する量が含まれます。

† AMPure, Beckman および Beckman Coulter は Beckman Coulter, Inc.の商標または登録商標です。

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

表 3 対応プローブ

プローブキャプチャライブラリ	Design ID	型番	
設計済みプローブ		16 反応	96 反応
SureSelect XT HS Human All Exon V8	S33266340	5191-6873	5191-6874
SureSelect XT HS Human All Exon V8+UTR	S33613271	5191-7401	5191-7402
SureSelect XT HS Human All Exon V8+NCV	S33699751	5191-7407	5191-7408
SSel XT HS and XT Low Input Human All Exon V7	S31285117	5191-4028	5191-4029
SureSelect XT HS Clinical Research Exome V4	S34226467	5280-0020	5280-0021
カスタムプローブ			
SureSelect Custom Tier1 1–499 kb	SureSelectカスタムプローブはカスタムデザインツールSureDesignでデザインできます。詳しくはお問い合わせください。		
SureSelect Custom Tier2 0.5 –2.9 Mb			
SureSelect Custom Tier3 3 –5.9 Mb			
SureSelect Custom Tier4 6 –11.9 Mb			
SureSelect Custom Tier5 12–24 Mb			
アジレントコミュニティデザイン: 様々な分野のエキスパートとのコラボレーションで作成されたカスタムパネルの情報は、弊社のコミュニティデザイン (NGS) サイトをご覧ください。	デザインの詳細や型番はSureDesignウェブサイトのPublished Designsタブをご覧ください。詳しくはお問い合わせください。		

追加で必要な試薬・器具

SureSelect XT HS2 プロトコルを完遂するために追加で必要な試薬・器具は次の項目によって異なります。

- ・ 様々な補足試薬を含む SureSelect XT HS2 DNA 試薬キットの構成成分
- ・ DNA のサンプルタイプ：新鮮/新鮮凍結組織由来の質の高い gDNA または FFPE 由来の gDNA
- ・ ワークフロー中の DNA サンプルの断片化方法：機械（コバリス）による切断または酵素による断片化

選択した DNA のサンプルタイプや断片化方法を使用したプロトコルを完遂するために、追加で必要な試薬・器具は表 4 から表 7 を参照してください。

1. はじめに

表 4 必要な試薬—すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法

その他の試薬（すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法）					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
AMPure® XP Kit (SPRI beads) ※	Beckman Coulter Genomics	A63880	指定	5 mL	大容量タイプ(60mL [A63881], 450mL [A63882])もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 ※	Thermo Fisher Scientific	65601	指定	2 mL	大容量タイプ(10mL [65602], 50mL [65604D]) もあります。
1xLow TE Buffer	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	10mM Tris-HCl, pH7.5 ~ 8.0, 0.1mM EDTA
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850	指定	100 assay	スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量 するために用います。大容量タイプ(500 assays [Q32853])もあります。

※SureSelect DNA AMPure® XP Beadsおよび/またはSureSelect Streptavidin Beadsを含んでいるSureSelect XT HS2 DNA Reagent kit をご利用の場合は、別途
購入する必要はありません。

CAUTION

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と、それに対応したサーマル
サイクラを使用してください（表 5）。

表 5 必要な器具・消耗品—すべてのサンプルタイプ・すべての断片化方法

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 (96ウェル、0.2 mlブロック)			相当		HotTop使用
サーマルサイクラに適した プラスチックウェア： ・ 96-well tube plates または8-well strip tubes ・ フラットまたはドーム型のcap strips※			相当		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 サーマルサイクラを使用してくだ さい。
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q33228	指定		スタート時のgDNAをできるだけ正確 に定量するために用います。
Qubit assay tubes	Thermo Fisher	Q32856	指定		QubitでgDNAを正確に定量するた めに用います。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを 使用ください。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンダウン用。卓 上遠心機でも可能。（例：日本ミリ ポア チビタンII）
96ウェルプレートもしくは8 strip tubes 遠心機	KUBOTA または ワケンビー テック		相当		96ウェルプレートもしくは8 strip tubesのスピンダウン用 ・ 96ウェルプレート用：PlateSpin II (KUBOTA) ・ 8 strip tubes用：卓上遠心機 プチ チェンジ（ワケンビーテック）

1. はじめに

MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003428000	相当	ストレプトアビジンビーズ溶液がウェル内でよく混ざるように、1,400 - 1,800 rpmで30分以上Mix可能なもの。フルスカート以外のPCRプレートや8 strip tubesで使用する場合は別売りのPCRプレートアタッチメントが必要。
MS3.5 96ウェルプレート用アタッチメント	IKA	0003428000	相当	フルスカート以外のPCRプレートや8 strip tubes使用時に上記MS3デジタルに装着して使用。
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12331D	相当	Dyna-Mag-96 (12331D) は96 well plate・8連チューブ兼用。 マグナススタンド [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				

※フラットまたはドーム型のストリップキャップの使用や、選択したキャップの最適なパフォーマンスに必要なアクセサリ（例：コンプレッションマット）の使用はサーマルサイクラの製造元の推奨に従ってください。使用するサーマルサイクラとプラスチックウェアの組み合わせで、サンプルウェルがしっかりと密閉されることが、熱伝達のために装置の加熱蓋とバイアルキャップが最適に接触することを確認してください。

1. はじめに

表 6 サンプルタイプや断片化方法に応じて必要な器具及び消耗品

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		ライブラリ調製の前にFFPEからDNAを精製するための推奨試薬
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)	指定	16または96反応分	FFPE由来DNAサンプルの場合、ゲノムDNA QCに使用します。
Genomic DNA Screen Tape	Agilent	5067-5365	指定	7枚	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
gDNAを機械で断片化する場合（酵素による切断には使用しません）					
Covaris Sample Preparation System	Covaris (エムエス機器)	Model E220	指定		E220以外のモデルをご使用の場合は製造元にお問い合わせください。ネブライザの使用は推奨しません。せん断条件の最適化後、コバリス装置やサンプルホルダーを追加して使用することもできます。
Covaris microTUBE sample holders	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		
gDNAを酵素反応で断片化する場合（機械による切断には使用しません）					
SureSelect Enzymatic Fragmentation System	Agilent	5191-4079 (16反応) 5191-4080 (96反応)	指定		SureSelect XT HS2 DNA Starter kit (G9982A) には含まれており、追加購入は必要ありません。

表 7 核酸分析プラットフォーム — いずれかの装置と対応した消耗品を選択

ライブラリQC用（お持ちの電気泳動装置に並び、いずれかの消耗品をご用意下さい。）					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
DNA解析用の電気泳動装置（いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。）					
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991AA / G2992AA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Agilent 2200 TapeStationの使用も可能です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer		M5310AA / M5311AA / M5312AA			
Agilent 4200/ 4150 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	112サンプル分	
96-well sample plate	Agilent	5042-8502	指定		
96-well plate foil seals	Agilent	5067-5154	指定		
8-well tube strips	Agilent	401428	指定		
8-well tube strip caps	Agilent	401425	指定		
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品					
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	10ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer消耗品					
NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	Agilent	DNF-473-0500	指定		
HS NGS Fragment Kit (1 - 6000 bp)	Agilent	DNF-474-0500	指定		

オプションの器具・試薬

表 8 オプションの器具・試薬

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。
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。

2. インプット DNA の準備と断片化

Step 1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認 19

新鮮なサンプル由来の質の高い gDNA の場合 19

FFPE サンプル由来の gDNA の調製と品質確認 19

Step 2. DNA の断片化 21

方法 1：コバリスを用いた DNA 断片化 21

方法 2：酵素による断片化 23

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、新鮮もしくは新鮮凍結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、65 ページ「**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。

NOTE

この段階で、データ解析アプリケーションに、ともに処理するサンプルの要件があるかどうかを検討します。アジレントの Alissa Reporter アプリケーションの要件は 62 ページに概要があります。

Step 1. ゲノム DNA サンプルの準備と品質確認

新鮮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、OD 260 / 280 の値が 1.8 ~ 2.0 であり高品質であることを確認してください。

2. Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。

新鮮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。21 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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. Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。
3. 以下に示す方法のいずれかを用いて、各 FFPE DNA サンプルの品質（分解度）を確認します。

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

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

2. インプット DNA の準備と断片化

- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μ L を、Agilent NGS FFPE DNA QC Kit 測定用に分注します。キットの使用方法は別途キットマニュアルをご参照ください。
- サンプルの適切なインプット DNA 量を表 9 にまとめられた $\Delta\Delta$ Cq 分解度スコアに基づくガイドラインに沿って決定します。

$\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコア ≤ 1 のサンプル（分解していない FFPE DNA サンプル）は、すべて Qubit に基づく濃度を用いてインプット DNA の量を決定してください。

$\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコア > 1 のサンプル（分解している FFPE DNA サンプル）は、全て 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 9 $\Delta\Delta$ Cq DNA 分解度スコアに基づく DNA インプット量のガイドライン

$\Delta\Delta$ Cq Score	DNA Input Guidelines
$\Delta\Delta$ Cq $\leq 1^*$	10 ng to 200 ng DNA, based on Qubit Assay quantification
$\Delta\Delta$ Cq > 1	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 の DIN を用いる方法

Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape Assay は、電気泳動パターンから DNA サンプルの分解度を解析できます。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 はその値をもとに DNA インプット量を決定します。

- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 μ L 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。
- DIN の値をもとに、表 10 の内容を参照して各サンプルのインプット量を決定してください。

表 10 DNA Integrity Number (DIN) の値に基づく 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 μ L 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。切断時間の推奨は表 11 をご参照ください。詳細な切断条件は以下にあります。

表 11 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 は、初期 DNA の断片サイズが切断処理後の断片サイズに影響があり、表に示したターゲットサイズより短くなることがあります。すべての FFPE サンプルは、ライブラリ構築に適した断片末端にするために 240 秒切断する必要があります。FFPE 由来サンプルから調製したライブラリは、最終的なライブラリのサイズ分布に適した NGS リード長で分析する必要があります。

始める前に、製造元の指示に従ってコバリスの装置を立ち上げます。プロトコルを開始する前に、脱気および恒温槽の冷却のために十分な時間をとってください（通常 30 ~ 60 分）。

NOTE

本プロトコルは、Covaris model E220 装置と 130 μ L Covaris microTUBE 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。

- 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 μ L 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。

NOTE

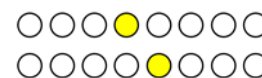
断片化する DNA を水で希釈しないでください。 水に溶解したサンプルを断片化すると、全体のライブラリ調製収量と complexity が下がります。

- 各 gDNA サンプルを、下記の手順にて断片化します。
 - 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 μ L の DNA サンプルを Covaris microTUBE に移します。

2. インプット DNA の準備と断片化

- 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 12 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 12 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 (see two-round instructions below)	2 × 60 seconds (see two-round instructions below)	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 12）。
 - ・ 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。
- 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 μ L）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。

2. インプット DNA の準備と断片化

- 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 μ L 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。2626 ページの「MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製」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. 使用するサーマルサイクラに対応したチューブあるいは PCR プレートに、最終量 7 μ L になるように 10 ng ~ 200 ng の gDNA を Nuclease free water または 1x Low TE Buffer で調製します。

もし DNA 濃度が低く、10 ~ 200 ng のインプット DNA を 7 μ L に調製できない場合は、サンプルの液量を適切な濃縮方法で減らしてください。サンプルの希釈についてのプロトコル変更は 84 ページのトラブルシュートガイドをご覧ください。

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 13 のように設定し、step7 で使用するまで一時停止しておきます。適切な断片化条件は、ワークフローによって異なります。表 14 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 酵素による断片化のサーマルサイクルプログラム（液量 10 μ L）

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	Varies--see Table 14
Step 2	65°C	5 minutes
Step 3	4°C	Hold

2. インプット DNA の準備と断片化

表 14 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 (Table 13)	
		High-quality DNA samples	FFPE DNA samples*
2 ×100 reads	150 to 200 bp	15 minutes	15 minutes
2 ×150 reads	180 to 250 bp	10 minutes	15 minutes

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

4. 表 15 を参照し、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 15 Fragmentation マスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions* (includes excess)	Volume for 24 reactions† (includes excess)
5X SureSelect Fragmentation Buffer	2 µL	18 µL	50 µL
SureSelect Fragmentation Enzyme	1 µL	9 µL	25 µL
Total	3 µL	27 µL	75 µL

*16 反応キットには、1 ランあたりに 8 サンプルを含めた場合の 2 ラン分に相当する量が含まれます。

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

- Fragmentation マスターミックス 3 µL を 7 µL の DNA が入っている各サンプルウェルに添加します。
- 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。
- すぐにサンプルをサーマルサイクラにセットし、スタートボタンを押し表 13 のサーマルプログラムを開始します。
- 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、サンプルをサーマルサイクラから取り出し、40 µL の Nuclease free water を各ウェルに添加後氷上におきます。この 50 µL の断片化 DNA サンプルを用い、末端修復と dA 付加から始まる NGS シーケンスライブラリを調製します。26 ページの「MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製」に進んでください。

2. インプット DNA の準備と断片化

NOTE

このステップはワークフロー中の 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. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

- Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製 28
- Step 2. DNA 3'端の末端修復および dA 付加 28
- Step 3. アダプターのライゲーション 30
- Step 4. AMPure XP ビーズを使用したライブラリの精製 31
- Step 5. プレキャプチャライブラリの増幅とインデックス付加 32
- Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製 35
- Step 7. プレキャプチャライブラリの QC と定量 36

この章では、gDNA 断片から NGS ライブラリを調製する方法を説明します。分子バーコード (MBC) を含む、または含まないアダプターを用いてライブラリを調製します。アダプター付加後、デュアルインデックスプライマーでライブラリを増幅します。シーケンスする各サンプルについて、個別のデュアルインデックスライブラリが調製されます。

複数サンプルを処理するために、このプロトコルでは余剰を含んだ試薬混合液を準備し、DNA ライブラリサンプルに分注します。各表には例として、8 または 24 反応分の試薬量が記載されています。

このステップは、機械による切断 (21 ページ) あるいは酵素による反応 (23 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 μ L に含まれています。

このプロトコルで使用する MBC なしのライブラリ調製キットは、SureSelect XT HS2 RNA プロトコルに従って調製した cDNA 断片から調整する MBC なしの RNA シーケンスライブラリの調製にも使用できます。cDNA ライブラリの調製は、次ページに記載のように MBC なしのアダプターオリゴミックスを希釈する必要があります。

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

このステップで使用する試薬は表 16 にまとめられています。使用する試薬を冷凍または冷蔵保管から取り出し、使用前に指示に従って準備します（Where used 欄を参照してください）。

表 16 使用前に融解する試薬

Storage Location	Kit Component	Preparative Steps	Where Used
For MBC-tagged libraries , get reagents from the <i>SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)</i> box, stored at -20°C For MBC-free libraries , get reagents from the <i>SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM, MBC-Free (Pre PCR)</i> box, stored at -20°C	Ligation Buffer (purple cap or bottle)	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice, vortex to mix	28 ページ
	T4 DNA Ligase (blue cap)	Place on ice just before use, invert to mix	28 ページ
	End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice, vortex to mix	29 ページ
	End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	Place on ice just before use, invert to mix	29 ページ
	For MBC-tagged libraries: XT HS2 Adaptor Oligo Mix (white cap) — For MBC-free libraries: SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix (black cap)	Thaw on ice then keep on ice, vortex to mix	30 ページ
	Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	Place on ice just before use, mix by pipetting	34 ページ
-20°C	5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	Thaw on ice then keep on ice, vortex to mix	34 ページ
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (select the specific set of indexes to be used in the run): Index Pairs 1-8 (blue strip) Index Pairs 9-16 (white strip) Index Pairs 1-96 (orange plate) Index Pairs 97-192 (blue plate) Index Pairs 193-288 (green plate) Index Pairs 289-384 (red plate)	Thaw on ice then keep or ice, vortex to mix	34 ページ
$+4^{\circ}\text{C}$	AMPure XP Beads	Equilibrate at room temperature (RT) for at least 30 minutes before use, vortex to mix	31 および 35 ページ

MBC なしの RNA ライブラリ調製のために追加で必要なステップ: MBC なしの RNA ライブラリを cDNA から調製するために、提供された SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix を 1X Low TE バッファで使用前に 5 倍希釈します。

96 反応分調製する場合は、 $100\ \mu\text{L}$ の SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix と $400\ \mu\text{L}$ の 1X Low TE バッファを混合します。ボルテックスで混合し、30 ページの step 3 まで氷上に置きます。ランごとに SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix を新しく希釈してください。

このアダプター希釈が完了した後に、通常の SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットのプロトコルに従い、XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix（緑のキャップ）の代わりに希釈した SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix を用いて MBC なしの RNA ライブラリを調製します。

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製

末端修飾/dA 付加のプロトコルを完了している間に、ライゲーションマスターミックスを調製し室温にします。この間サンプルは氷上に置いておきます。

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。step 1 と step 2 の方法に従って混合してください。

1. 融解した Ligation Buffer を、使用直前に高速のボルテックスで 15 秒間撹拌します。
2. 表 17 の試薬を混合して、適切な量のライゲーションマスターミックスを調製します。Ligation Buffer をピペットでゆっくりと吸い上げ 1.5 mL チューブにいれ、全量が吐き出されたことを確認します。T4 DNA Ligase をゆっくりと加えた後、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 秒撹拌しよく混合します。チューブを軽く遠心します。

30 ページで使用するまで、30 ~ 45 分間室温に置きます。

表 17 ライゲーションマスターミックスの調製

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

*16 反応キットでの 1 回あたりの最少推奨反応数は 8 反応です。キットには 8 サンプルを 2 回実験する分の量が含まれます。

†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. DNA 3'端の末端修復および dA 付加

CAUTION

このステップで使用する End Repair-A Tailing Buffer は粘性が非常に高いです。29 ページの step 2 と step 3 の方法に従って混合してください。

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

1. 表 18 のようにサーマルサイクラをプログラムします。step5 で使用するまで一時停止します。

表 18 末端修復/dA 付加のサーマルサイクラプログラム（液量 70 μ L）

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

2. 溶解した End Repair-A Tailing Buffer を高速のボルテックスで 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による攪拌を続けます。
3. 表 19 の試薬を混合して、適切な量の末端修復/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 チューブにいれ、全量が吐き出されたことを確認します。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。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ゆっくり 15 ~ 20 回繰り返すか、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。チューブを軽く遠心し、氷上に置きます。

表 19 末端修復/dA 付加のマスターミックスの調製

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

4. 50 μ L の断片化 DNA の入った各サンプルウェルに 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。
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、表 18 の通り設定したサーマルサイクラのプログラムを開始します。

Step 3. アダプターのライゲーション

1. 表 18 のサーマルサイクラプログラムが 4 °C Hold のステップになったら、サンプルを氷上に移し、表 20 のサーマルプログラムを設定します。Step 4 で使用するまで一時停止します。

表 20 ライゲーションのサーマルサイクラプログラム（液量 100 μ L）

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

2. 末端修復・dA 付加反応済みの各 DNA サンプル（液量 約 70 μ L）に、ライゲーションマスターミックス（28 ページで調製済み）を 25 μ L 加え、室温に置きます。70 μ L 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。
3. 各サンプルに 5 μ L の適切な SureSelect Adaptor Oligo Mix を加えます。
 - ・ **MBC 付きのライブラリ** – 5 μ L の XT HS2 Adaptor Oligo Mix（白いキャップ）
 - ・ **MBC なしのライブラリ** – 5 μ L の SureSelect MBC-Free Adaptor Oligo Mix（黒いキャップ）

70 μ L に設定したピペットで 15 ~ 20 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。

NOTE

上記に記載のように、ライゲーション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、各ステップで加えた後は、必ず混合してください。

cDNA サンプルから MBC なし RNA ライブラリを作成する場合は、使用前に必ず MBC-Free Adaptor Oligo Mix を 5 倍希釈し、続くすべてのステップは SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットのプロトコルに従ってください。

4. サンプルを軽く遠心し、すぐにプレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラにいれ、表 20 のサーマルサイクラプログラムを再開します。

NOTE

次のステップで使用する AMPure XP ビーズは、使用前に少なくとも 30 分は室温に置く必要があります。

Step 4. AMPure XP ビーズを使用したライブラリの精製

表 20 のサーマルサイクラプログラム 4°C hold のステップに入ったら、室温にしておいた AMPure XP ビーズでライブラリを精製します。

精製プロトコルの重要な項目は表 21 をご覧ください。

表 21 アダプターライゲーション後の AMPure XP ビーズ精製項目

項目	液量
各サンプルウェルに加える室温の AMPure XP ビーズの液量	80 μ L
溶出溶媒と液量	35 μ L の nuclease-free water
新しいウェルに移す溶出サンプル液量	約 34 μ L

- 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

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。

- 室温になった AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
- DNA サンプルをサーマルサイクラから室温に取り出し、各サンプルウェルに 80 μ L のビーズ溶液を添加します。
- 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。ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンし液を集めます。
- 室温で、5 分間インキュベーションします。
- 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）。
- 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。
- 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 μ L ずつ加えます。
- 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

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

込まないように注意して取り除きます。

10. step 8 と step 9 を繰り返し、計 2 回洗浄します。

11. 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 μ L 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。

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。

12. 蓋をせずにプレートもしくは 8 strip tube を 37 °C のサーマルサイクラにセットして、残存エタノールを完全に取り除きます（最長 2 分）。

または代わりに、蓋をせずにプレートもしくは 8 strip tube を卓上に約 5 分または残存エタノールがなくなるまで静置します。

13. 35 μ L の Nuclease-free water を各サンプルウェルに加えることで、ライブラリ DNA を溶出します。

14. ピペティングを 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。すべてのビーズが再懸濁され、懸濁液にビーズの塊がないことや壁にビーズのペレットが残っていないことを確認します。サンプルが混合されたら、ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンし液を集めます。

15. 室温で 2 分間インキュベーションします。

16. 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（最長 5 分）。

17. 上澄み液（液量 約 34 μ L）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。

Step 5. プレキャプチャライブラリの増幅とインデックス付加

1. 各サンプルに割り当てるインデックスペアを決めます。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 73 ページの表 58 ~ 80 ページの表 65 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ペアを用いてください。

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

NOTE

Agilent SureSelect XT HS2 のインデックスペアは、全てのプラットフォームとフォーマットで、統一した番号付けを行っています。例えば 96 反応キットのオレンジ色のプレートで提供しているインデックスペア 1~8 は、16 反応キットの青いストリップチューブの 1~8 および Magnis 自動化システムの黒いインデックスストリップ (DI) と同等です。マルチプレックスシーケンス用に、異なるキットフォーマットの同じ番号のインデックスペアでインデックス付加したサンプルを混合しないでください。

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. サーマルサイクラを表 22 のように設定します。Step6 で使用するまで一時停止します。

表 22 プレキャプチャ PCR のサーマルサイクラプログラム (液量 50 μ L、蓋は加熱)

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	インプット DNA の質と量に基づいて 8 ~ 14 サイクル (表 23 を参照)	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

表 23 プレキャプチャ PCR の推奨サイクル数

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

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応溶液（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。

- 表 24 の試薬を混合して、適切な量のプレキャプチャ PCR 反応のマスターミックスを氷上で調製します。ボルテックスミキサーでよく混合します。

表 24 プレキャプチャ PCR 反応のマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
5x Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µL	90 µL	260 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	9 µL	26 µL
Total	11 µL	99 µL	286 µL

- 表 24 の内容で調製したプレキャプチャ PCR 反応のマスターミックス 11 µL を各精製 DNA ライブラリサンプルのウェル（液量 約 34 µL）に加えます。
- 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ーで 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。
- サンプルをサーマルサイクラに移す前に、表 22 のサーマル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。

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。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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。

NOTE

次のステップで使用する AMPure XP ビーズは、使用前に少なくとも 30 分は室温に置く必要があります。

Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

表 22 のサーマルサイクラプログラム 4°C hold のステップに入ったら、室温にしておいた AMPure XP ビーズでライブラリを精製します。

精製プロトコルの重要な項目は表 25 をご覧ください。

表 25 プレキャプチャ PCR 後の AMPure XP ビーズ精製項目

項目	液量
各サンプルウェルに加える室温の AMPure XP ビーズの液量	50 μ L
溶出溶媒と液量	15 μ L の nuclease-free water
新しいウェルに移す溶出サンプル液量	約 15 μ L

- 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。
- 室温になった 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。
- ライブラリ DNA サンプルをサーマルサイクラから室温に移し、各サンプルウェルに AMPure XP ビーズ溶液 50 μ L を加えます。
- ピペティングを 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。ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンしサンプルを集めます。
- 室温で 5 分間インキュベーションします。
- 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）。
- 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。
- 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サンプルウェルに 200 μ L ずつ加えます。
- 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。
- ステップ 8 と 9 をもう一度繰り返し、計 2 回洗浄します。
- プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、蓋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

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

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 μ L 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。

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。

12. 蓋をせずに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、37 °C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます（最長 2 分）。
または代わりに、蓋をせずにプレートもしくは 8 strip tube を卓上に約 5 分または残存エタノールがなくなるまで静置します。
13. 15 μ L の Nuclease-free water を各サンプルウェルに加え、ライブラリ DNA を溶出します。
14. ピペッティングを 10 ~ 15 程度行うか、ウェルに蓋をして高速のボルテックスで 5 秒攪拌することで混合します。すべてのビーズが再懸濁され、懸濁液にビーズの塊がないことや壁にビーズのペレットが残っていないことを確認します。サンプルが混合されたら、ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンし液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで静置します（最長 5 分）。
17. 透明な上澄み液（液量 約 15 μ L）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。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point

同じ日にハイブリダイゼーションステップに進まない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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（必要に応じて、保存前に QC 用に分注してください）。

Step 7. プレキャプチャライブラリの QC と定量

表 26 にあるいずれかのプラットフォームを用いて各サンプルライブラリを分析します。各プラットフォームの使用方法は、弊社サポートサイトをご覧ください。

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

表 26 プレキャプチャライブラリの分析オプション

分析オプション	本ステップで使用するアッセイ	分析に使用するライブラリサンプルの液量
Agilent 4200/4150 TapeStation system	D1000 ScreenTape	5 倍希釈し 1 μ L
Agilent 2100 Bioanalyzer system	DNA 1000 Kit	5 倍希釈し 1 μ L
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer system	NGS Fragment Kit (1-6000 bp)	5 倍希釈し 2 μ L

各分析方法はサンプル中の断片のサイズ分布をエレクトロフェログラムとして表示し、サンプル中の DNA 濃度を決定するツールがあります。断片のサイズ分布のガイドラインは表 27 をご覧ください。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図 2～図 4 に示しています。

ピーク全体を積分することで、ライブラリ DNA の濃度を決定します。

表 27 プレキャプチャライブラリのガイドライン

NGS read length used for fragmentation protocol selection	Fragmentation method	Input DNA type	Expected average fragment size for pre-capture library
2 ×100 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	300 to 375 bp
		FFPE DNA	300 to 450 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	325 to 400 bp
		FFPE DNA	300 to 450 bp
2 ×150 reads	Mechanical shearing	Intact DNA	350 to 450 bp
		FFPE DNA	300 to 450 bp
	Enzymatic fragmentation	Intact DNA	350 to 450 bp
		FFPE DNA	300 to 450 bp

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 86 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. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

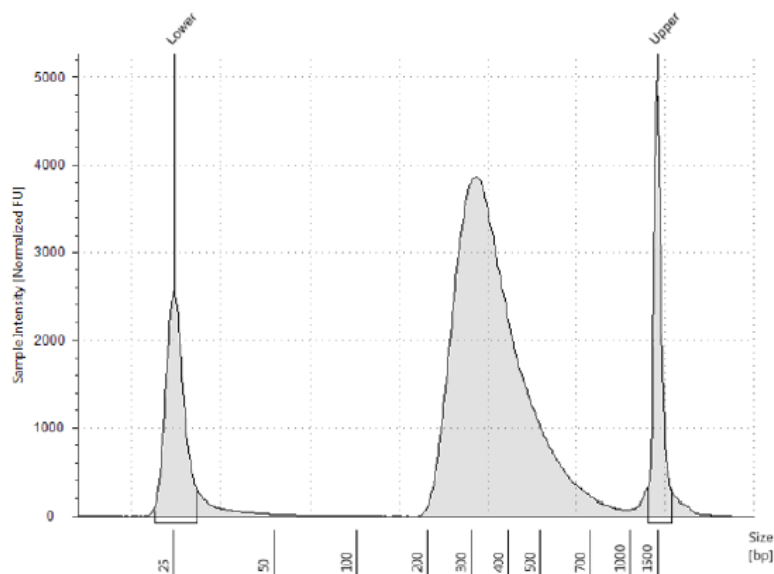


図 2 断片化された高品質な gDNA サンプルから調製したキャプチャ前ライブラリの泳動図 (D1000 ScreenTape アッセイ)

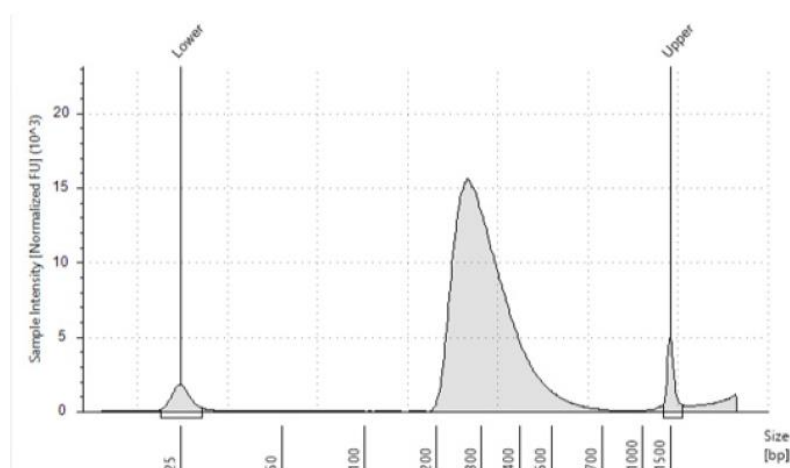


図 3 典型的な FFPE gDNA サンプル（機械による断片化）から調製したキャプチャ前ライブラリの泳動図 (D1000 ScreenTape アッセイ)

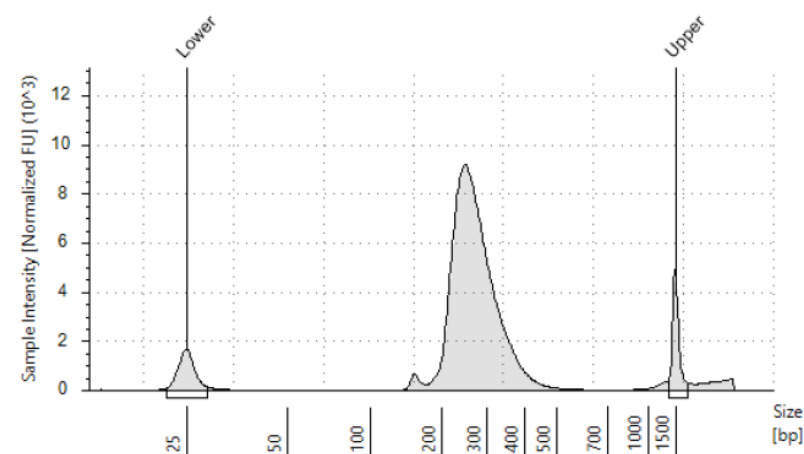


図 4 低品質 FFPE gDNA サンプル（機械による断片化）から調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図 (D1000 ScreenTape アッセイ)

3. MBC 付きまたは MBC なしのアダプターを用いたライブラリ調製

**Stopping
Point**

次のステップに進まない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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、キャプチャおよび増幅

Step 1. ライブラリを SureSelect プローブへハイブリダイズする 42

Step 2. キャプチャに使用するストレプトアビジンビーズの調製 45

Step 3. ハイブリダイズしたライブラリのキャプチャ 46

Step 4. キャプチャしたライブラリの増幅 47

Step 5. AMPure XP ビーズを使用した最終ライブラリの精製 49

Step 6. 最終ライブラリの QC および定量 51

この章では、前章で調製した gDNA ライブラリをターゲット特異的なプローブとハイブリダイゼーションする工程が示されています。ハイブリダイゼーション後、ターゲットの DNA をストレプトアビジンビーズでキャプチャします。マルチプレックス NGS に向けプーリングする前に、各 DNA サンプルをハイブリダイズ、キャプチャし増幅します。

標準的な 1 日で操作する SureSelect XT HS2 プロトコルは、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。

ハイブリダイゼーションの反応には、準備したライブラリを 500 ~ 1000 ng の範囲でなるべく最大量を、液量 12 μ L で使用します。

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

ハイブリダイゼーションおよびキャプチャのワークフローは表 28 の試薬を使用します。表にある試薬を冷蔵保存から指定の状態に移し、使用前に準備します（*Where Used* のコラムを参照してください）。

表 28 ハイブリダイゼーションおよびキャプチャで使用する試薬

Storage Location	Kit Component	Preparative Steps	Where Used
SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), stored at -20°C	SureSelect XT HS2 Blocker Mix (blue cap)	Thaw and keep on ice, vortex to mix	43 ページ
	SureSelect RNase Block (purple cap)	Thaw and keep on ice, vortex to mix	43 ページ
	SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	Thaw and keep at room temperature	44 ページ
-80°C	SureSelect Probe	Thaw and keep on ice, vortex to mix	44 ページ
+4°C	SureSelect Streptavidin Beads (clear cap or bottle) OR Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Beads	Remove from 4°C just before use, vortex to mix	45 ページ
SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), stored at RT	SureSelect Binding Buffer (bottle)	Ready to use	45 ページ
	SureSelect Wash Buffer 1 (bottle)	Ready to use	46 ページ
	SureSelect Wash Buffer 2 (bottle)	Ready to use	46 ページ

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

Step 1. ライブラリを SureSelect プローブへハイブリダイズする

1. SureSelect XT HS Human All Exon V8 プローブ (V8 / V8 + UTR / V8 + NCV) および SureSelect XT HS Clinical Research Exome V4 は表 29、その他の全てのプローブは表 30 のようにサーマルサイクラをプログラムします (蓋は加熱)。サンプルを step 4 で入れるまで一時停止します。

表 29 SureSelect XT HS Human All Exon V8 / V8 + UTR / V8 + NCV および SureSelect XT HS Clinical Research Exome V4 プローブのハイブリダイゼーションプログラム (液量 30 μ L、蓋は加熱)

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	Hold for reagent addition (see step 7 on page 37)
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 page 38

表 30 その他の全ての SureSelect XT HS プローブのハイブリダイゼーションプログラム* (液量 30 μ L、蓋は加熱)

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	Hold for reagent addition (see step 7 on page 37)
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C [†]	Hold briefly until ready to begin capture steps on page 38

* この表のプログラムは、SureSelect XT HS プローブデザインの Fast Hybridization ワークフローに最適化されています。SureSelect XT プローブデザインは、通常 Overnight Hybridization ワークフローを使用することで性能が向上します。

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

NOTE

このプロトコルは、次の変更を加えることで一晩休止して 2 日間のワークフローに変更可能です。

- ・ サーマルプログラム（表 29 または表 30）の最後のセグメントを 65°C Hold から 21°C Hold に変更します。
- ・ ハイブリダイズしたサンプルは、21°C で 16 時間までおくことができます。一晩の Hold 後、2 日目を 45 ページのキャプチャ準備のステップから始めます。

2. 1000 ng の各 DNA ライブラリをハイブリダイゼーション用に準備したプレートもしくは 8 strip tube に入れ、最終容量 12 μ L になるように Nuclease-free water を加えます。1000 ng の DNA ライブラリが得られない場合は、500 ~ 1000 ng の範囲内でなるべく多い量を使用してください。
3. 各 DNA ライブラリサンプルに、SureSelect XT HS2 Blocker Mix を 5 μ L 加えます。プレートもしくはチューブに蓋をし、高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌し混合します。軽くスピン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。

4. 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、42 ページの表 29 または表 30 の通り設定されたサーマルプログラムを開始します。プログラムのセグメント 1 および 2 を完了させセグメント 3 Hold に進みます。

重要：セグメント 3 Hold の間に追加の試薬をサーマルサイクラ中のサンプルウェルに加えます。セグメント 1 および 2 の間に step 5 および step 6 に従って、追加のハイブリダイゼーション試薬を調製します。必要な場合サーマルサイクラのセグメント 3 の 65°C Hold の間に調製してもかまいません。

5. 表 31 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 31 RNase block Solution の調製

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

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

NOTE

Step 7 でサーマルサイクラプログラム Segment3 Hold の間に DNA サンプルに加える直前に、ステップ 6 の試薬を調製します。調製した試薬を室温に保つのは、調製ステップの間だけにしてください。プローブを含む溶液を長時間室温に置かないでください。

6. 使用するキャプチャライブラリのターゲットサイズに応じて、Probe Hybridization Mix を調製します。

ターゲットサイズ 3 Mb 以上のキャプチャライブラリでは表 32、ターゲットサイズ 3 Mb 未満のキャプチャライブラリでは表 33 の内容に従ってください。カスタムデザインのプローブは、デザインサイズをプローブチューブのラベルでご確認ください。

表に記載されている溶液を室温で混合します。 高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌しよく混合したあと、軽くスピンドウンします。すぐに step 7 に進みます。

表 32 ターゲットサイズ **3 Mb 以上** のプローブの Probe Hybridization Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 5)	2 μ L	18 μ L	50 μ L
Probe (with design $\geq$ 3 Mb)	5 μ L	45 μ L	125 μ L
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 μ L	54 μ L	150 μ L
Total	13 μ L	117 μ L	325 μ L

表 33 ターゲットサイズ **3 Mb 未満** のプローブの Probe Hybridization Mix の調製

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

7. サーマルプログラムの Segment 3 Hold が始まったら、DNA + Blocker サンプルをサーマルサイクラにいたまま、step 6 で調製して室温に置いてある Probe Hybridization Mix 13 μ L を各サンプルウェルに加えます。

ゆっくり 8 ~ 10 回ピペッティングしよく混合します。

この時点で、ハイブリダイゼーション反応液の液量は約 30 μ L 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。適切なキャッピングツールなどを用いて、全チューブ (well) を確実に密閉します。軽くボルテックスで混合し、軽くプレートもしくは 8 strip tube を遠心しチューブ底の泡をのぞき、すぐにサーマルサイクラに戻します。

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

- サーマルサイクラのプログラムを再開し、調製したライブラリ DNA サンプルをプローブにハイブリダイズします。

CAUTION

蒸発を最小限にするためにウェルは確実に密閉されている必要があります。わずかでも隙間があると液が蒸発し、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 μ L 以上の溶液が蒸発しないことを確認してください。

Step 2. キャプチャに使用するストレプトアビジンビーズの調製

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 step 9 のハイブリダイゼーション反応を開始した約 1 時間後に、以降のビーズ調製を始めてください。21 °C Hold で一晩おきキャプチャを次の日に行う場合は、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。

- 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。
- 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 μ L、各チューブ (well) に入れます。
- 下記手順に従いビーズを洗浄します。
 - 200 μ L の SureSelect Binding Buffer を加えます。
 - 20 回ピペッティングするか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5~10 秒攪拌することにより、ビーズを混合し、軽くスピンドウンします。
 - 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。
 - 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。
 - 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。
- ビーズを 200 μ L の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。

NOTE

さらに大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 3. ハイブリダイズしたライブラリのキャプチャ

1. ストレプトアビジンビーズの調製が完了し、ハイブリダイゼーションのサーマルサイクラプログラムが最後の Hold ステップ（42 ページ 表 29 または表 30 参照）に到達したら、サンプルをサーマルサイクラから室温に移します。
2. すぐに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 μ L）を、洗浄済みストレプトアビジンビーズ 200 μ L の入ったウェルに移します。

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 μ L ずつ各チューブ（well）に入れます。1 サンプルあたり 6 チューブ準備します。
 - b. プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、70 °C で保温したサーマルサイクラ（蓋を加熱）で 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 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 ~ 2 分）。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. ビーズに 200 μ L 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）。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。

CAUTION

キャプチャの特異性を確保するためには、以降の洗浄工程でビーズ懸濁液を 70 °C に維持することが重要です。

SureSelect Wash Buffer 2 が事前に 70 °C で温められていることを確認してください。

組織培養用のインキュベーターや、その他温度振れ幅の大きい装置は使用しないでください。

9. **プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、室温のチューブラックに移し**

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

ます。 以下の手順に従い、ビーズを Wash Buffer 2 で洗浄します。

- 70 °Cで予め温めた Wash Buffer 2 を 200 μ L、磁気ビーズに加え、15 ~ 20 回ピペティングを行い、ビーズを完全に懸濁します。
- 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。

- 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）。
 - 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。
 - 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。
 - 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 μ L ずつ、各サンプルに加えます。ピペティングを 8 回行い、ビーズを再懸濁します。
11. 以下の PCR 反応で使用するまで氷上に置きます。

NOTE

キャプチャした DNA はポストキャプチャ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。

Step 4. キャプチャしたライブラリの増幅

このステップでは、表 34 の試薬を使用します。表にある試薬を冷蔵保存から指定の状態に移し、使用前に準備します（*Where Used* のコラムを参照してください）。

表 34 ポストキャプチャ PCR で使用する試薬

Storage Location	Kit Component	Preparative Steps	Where Used
SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), stored at -20°C	Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	Place on ice just before use, pipette to mix	48 ページ
	5x Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	Thaw and keep on ice, vortex to mix	48 ページ
	SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	Thaw and keep on ice, vortex to mix	48 ページ
+4°C	AMPure XP Beads	Equilibrate at room temperature for at least 30 minutes before use, vortex to mix	49 ページ

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

1. サーマルサイクラを表 35 のように設定し、step 5 で使用するまで一時停止します。

表 35 ポストキャプチャ PCR のサーマルサイクラプログラム（液量 50 μ L、蓋は加熱）

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10 ~ 16（プローブデザインのサイズに基づく推奨サイクル数は表 36 を参照してください）	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

表 36 ポストキャプチャ PCR の推奨サイクル数

Probe Design Size	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 and Exome probes)	10–11 cycles

2. 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 ポストキャプチャ PCR のマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	13 μ L	117 μ L	338 μ L
5x Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 μ L	90 μ L	260 μ L
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 μ L	9 μ L	26 μ L
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	1 μ L	9 μ L	26 μ L
Total	25 μ L	225 μ L	650 μ L

3. 表 37 の内容で調製したポストキャプチャ PCR のマスターミックス 25 μ L 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 が 25 μ L 入った各サンプルウェルに加えます。
4. PCR 反応ウェルを、ビーズが均一になるまでピペ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。

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

- 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の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。
- 上澄み液（液量 約 50 μ L）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。

CAUTION

このステップでは、各サンプルの上清を必ず保持し次のステップに進みます。

NOTE

次のステップで使用する AMPure XP ビーズは、使用前に少なくとも 30 分以上室温に置く必要があります。

Stopping Point

次のステップに進まない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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。

Step 5. AMPure XP ビーズを使用した最終ライブラリの精製

増幅したライブラリを室温の AMPure XP ビーズを使用して精製します。精製プロトコルの重要な項目は表 38 をご覧ください。

表 38 ポストキャプチャ PCR の AMPure XP ビーズ精製項目

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	50 μ L
Final elution solvent and volume	25 μ L Low TE Buffer
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 25 μ L

- 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。
- 室温になった 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

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

サでよく混合します。

3. AMPure XP ビーズ溶液 50 μ L を各ウェルの増幅 DNA サンプル（約 50 μ L）に加えます。
4. ピペティングを 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。ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンしサンプルを集めます。
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 2~5 分）。
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サンプルウェルに 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、計 2 回洗浄します。
11. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、蓋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 μ L 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。

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。

12. 蓋をせずに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、37 °C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます（最長 2 分）。
または代わりに、蓋をせずにプレートもしくは 8 strip tube を卓上に約 5 分または残存エタノールがなくなるまで静置します。
13. 25 μ L の Low TE buffer を各サンプルウェルに加え、ライブラリ DNA を溶出します。
14. ピペティングを 10 ~ 15 程度行うか、ウェルに蓋をして高速のボルテックスで 5 秒攪拌することで混合します。すべてのビーズが再懸濁され、懸濁液にビーズの塊がないことや壁にビーズのペレットが残っていないことを確認します。サンプルが混合されたら、ビーズが底に集まらないように注意しながら、軽くスピンドウンし液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

16. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで静置します（最長 5 分）。
17. 透明な上澄み液（液量 約 25 μ L）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。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point

同じ日に NGS ステップに向けライブラリをプールしない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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（必要に応じて、保存前に QC 用に分注してください）。

Step 6. 最終ライブラリの QC および定量

表 39 にあるいずれかのプラットフォームを用いて各サンプルライブラリを分析します。各プラットフォームの使用方法は、弊社サポートサイトをご覧ください。

表 39 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 4200/4150 TapeStation system	High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide	2 μ L
Agilent 2100 Bioanalyzer system	High Sensitivity DNA Kit	Agilent High Sensitivity DNA Kit Guide	1 μ L
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer system	HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp)	Agilent HS NGS Fragment Kit (1-6000 bp) Kit Guide	2 μ L

各分析方法はサンプル中の断片のサイズ分布をエレクトロフェログラムとして表示し、サンプル中の DNA 濃度を決定するツールがあります。断片のサイズ分布のガイドラインは表 40 をご覧ください。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

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

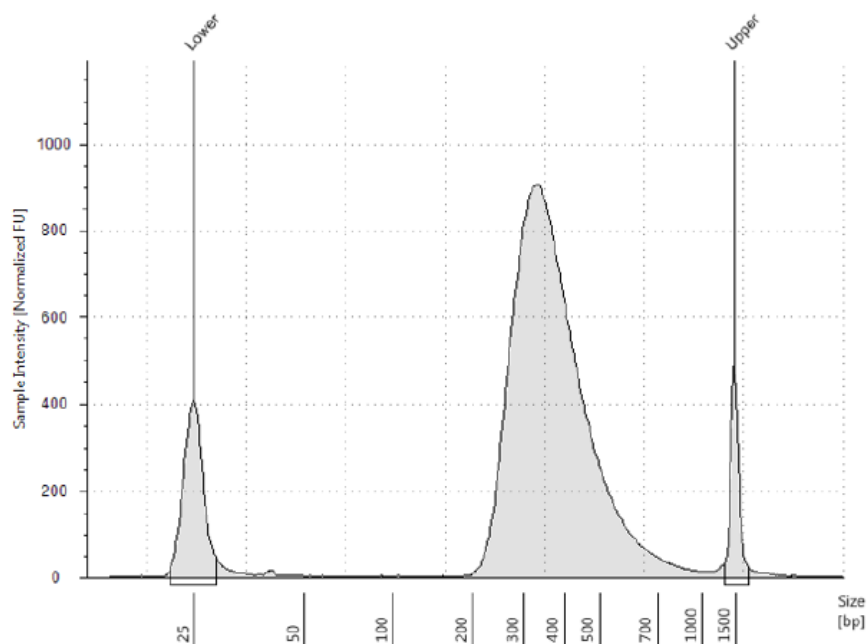


図 5～図 7 に示しています。

ピーク全体を積分することで、ライブラリ DNA の濃度を決定します。

表 40 ポストキャプチャライブラリの定量ガイドライン

NGS read length used for fragmentation protocol selection	Input DNA type	Expected DNA fragment size peak position
2 × 100 reads	Intact DNA	300 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	330 to 450 bp
	FFPE DNA	200 to 450 bp

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

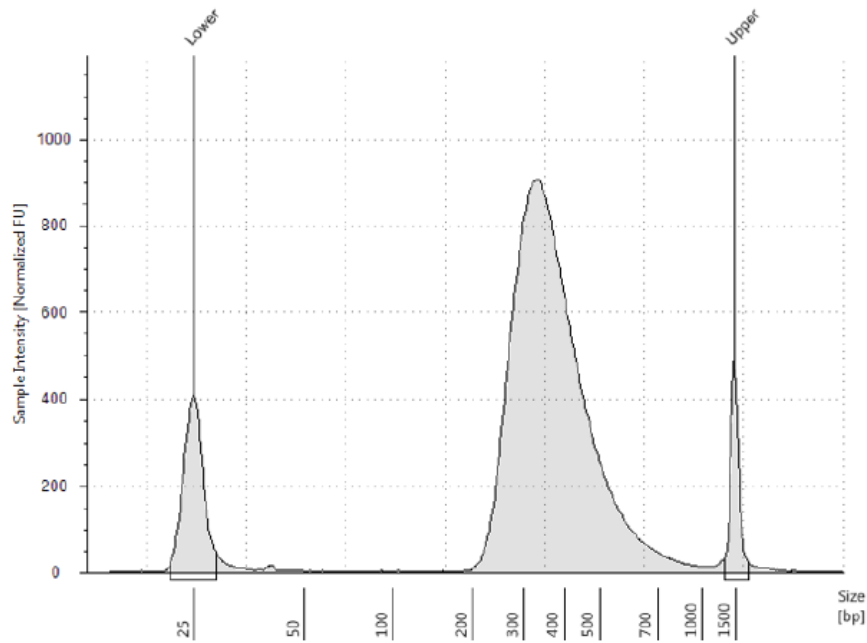


図 5 高品質な gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

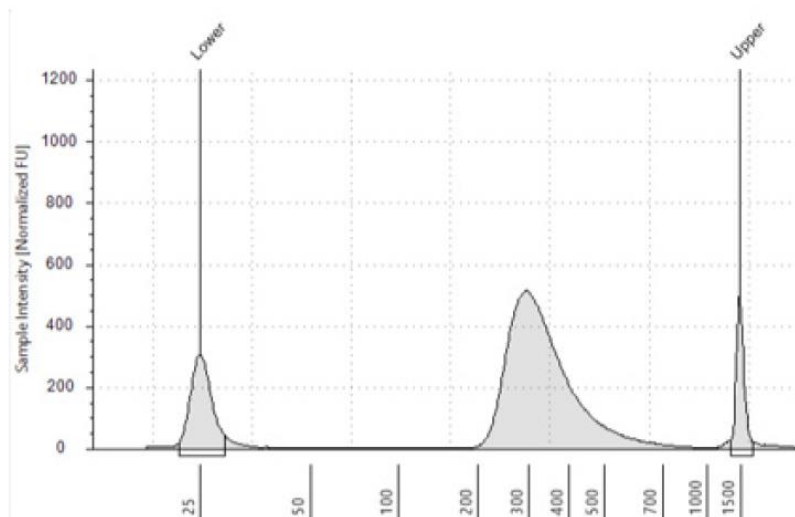


図 6 典型的な FFPE 由来 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

4. ハイブリダイゼーション、キャプチャおよび増幅

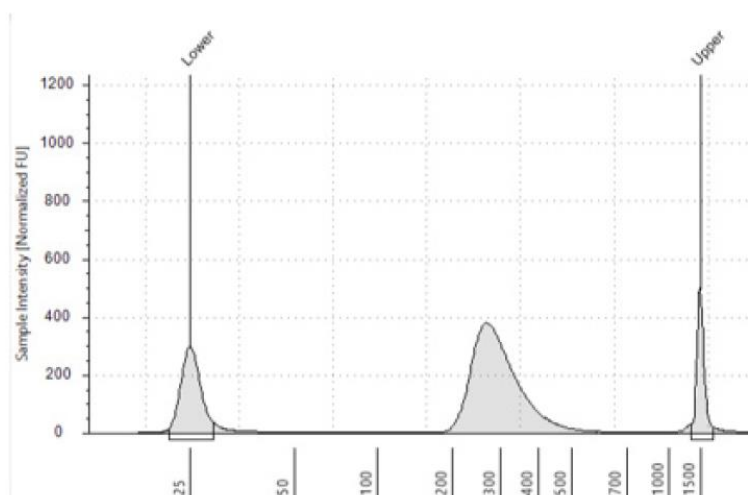


図 7 低品質な FFPE 由来 gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity D1000 ScreenTape アッセイ)

Stopping Point	
---------------------------	--

	次のステップに進まない場合は、サンプルウェルに蓋をして 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。
--	---

5. NGS および解析のガイドライン

Step 1. マルチプレックスシーケンスのためサンプルのプール 56

Step 2. シーケンスサンプルの調製 58

Step 3. ライブラリのシーケンス 59

Step 4. リード処理と解析 60

この章は、ワークフロー中の NGS および解析部分のガイドラインです。

Step 1. マルチプレックスシーケンスのためサンプルのプール

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

以下のいずれかの手順に従い、各インデックスライブラリをプール中で等モル量になるように混合します。希釈には、Low TE などシーケンスプロバイダーが指定した希釈液を使用してください。

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

表 41 10 nM の濃度でとータル 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

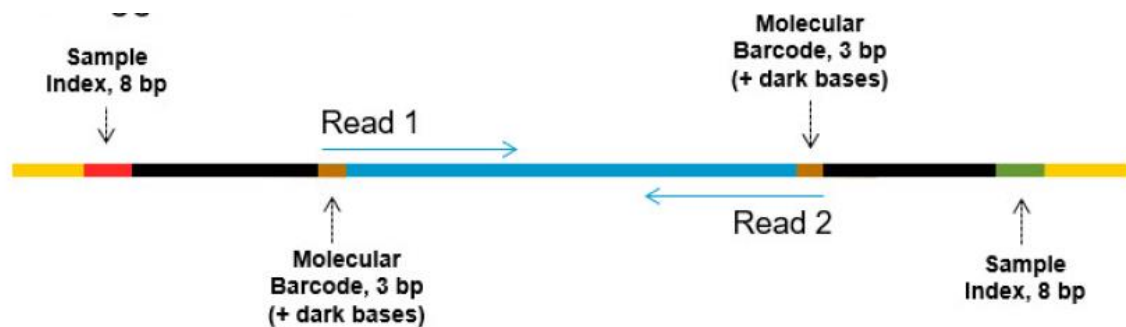
もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 を 0.1% v/v になるように加え、-20 $^{\circ}$ C で保存します。またはシーケンスプロバイダーが提示している条件で保存してください。

5. NGS および解析のガイドライン

Step 2. 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、イルミナ社のシーケンサを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

MBC 付きのライブラリ



MBC なしのライブラリ

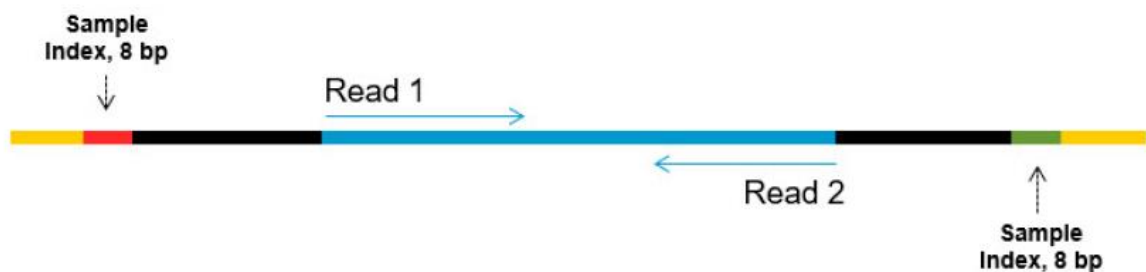


図 8 SureSelect XT HS2 シーケンスライブラリの構造

各断片は 1 つのターゲットインサート（青）に、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）、ライブラリ PCR プライマー（黄）およびオプションでデュアル分子バーコード（茶）が付加されています。

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。表 42 は、本アプリケーションに適したシーケンサとケミストリの組み合わせのガイドラインです。その他のイルミナ社 NGS プラットフォームについては、キットの構成およびシーディング濃度のガイドラインについてイルミナ社のドキュメントを参照してください。

表 42 イルミナ社キットの選択ガイドライン

Instrument	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry	Seeding Concentration
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
iSeq 100	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2	50–150 pM
NextSeq 500/550	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
NextSeq 1000/2000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	200 or 300 Cycle Kit	v1, v2, or v3	650–1000 pM
HiSeq 4000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	200 or 300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	200 or 300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	200–400 pM
NovaSeq X	All runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	100, 200 or 300 Cycle Kit	v1	90–180 pM

シーディング濃度とクラスタ密度は、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 42 またはイルミナ社提供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。

Step 3. ライブラリのシーケンス

各サンプルの Read1 および Read2 の FASTQ ファイルを得るために、スタンドアローンモードで装置のソフトウェアを使用するか、Local Run Manager (LRM) や Illumina Experiment Manager (IEM)、または BaseSpace などのイルミナ社のラン管理ツールを使用して、シーケンシングのラン設定を行います。ライブラリのリード長や使用した 8 bp のデュアルインデクスリードに適切なサイクル数やリード長を入力します。表 43 は 2 × 150 bp のシーケンシングの設定例です。

表 43 2 × 150 bp のシーケンシングのラン設定

Run Segment	Cycles/Read Length
Read 1	151*
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	151*

* イルミナ社の推奨に従い、目的のリード長に 1 サイクル追加します。

5. NGS および解析のガイドライン

イルミナの各プラットフォームおよびセットアップソフトウェアオプションに関する説明に従い、以下の追加セットアップガイドラインを組み込んでください。

- ・ 各サンプルレベルインデックス (i7 および i5) は 8-bp インデックスリードが必要です。インデックスの配列情報は 73 ページ表 58~80 ページ表 65 を参照してください。
- ・ SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンシングでは、カスタムプライマーは使用しません。Read 1、Read 2、Index 1 および Index 2 プライマーの Custom Primers オプションは、ランセットアップ中に全てクリア・設定解除をしておいてください。
- ・ MBC 付きのライブラリの場合、イルミナのランセットアップおよびリード処理ソフトウェアアプリケーションに含まれるアダプタートリミングツールはオフにしてください。アダプターは、アジレントのソフトウェアツールを使用し後のステップでトリミングします。アダプター配列中の MBC を除くことも含め適切なアダプター処理がなされます。
- ・ イルミナの LRM、IEM または BaseSpace アプリケーションを用いてセットアップしたランについて、選択したソフトウェアで custom library prep kit およびインデックスキットを使用してランをセットアップするためのイルミナの説明書およびサポートリソースを参照してください。これらのアプリケーションを使用する際は、73 ページ表 58~80 ページ表 65 にある SureSelect XT HS2 のインデックス配列を、イルミナ社の各アプリケーションの仕様に従って .tsv/.csv ファイルフォーマットに変換するか、Sample Sheet にコピーしてください。もし選択したアプリケーションで SureSelect XT HS2 のラン設定についてサポートが必要な場合は、最終ページにある弊社サポート窓口にお問い合わせください。

Step 4. リード処理と解析

SureSelect XT HS2 DNA ライブラリに適した、典型的な NGS リード処理および解析パイプラインのガイドラインです。お客様の解析パイプラインは異なる場合があります。

- ・ イルミナの bcl2fastq、BCL Convert または DRAGEN ソフトウェアを用いてデマルチプレックスし、デュアルインデックスに基づいたペアエンドの生成や不正確な P5 および P7 インデックスペアの配列を除去します。MBC 付きのライブラリの場合は、アジレントの NGS ソフトウェアツールで適切なアダプター処理と MBC を使用するため、イルミナのデマルチプレックスソフトウェアの MBC/UMI トリミング機能はオフにします。
- ・ デマルチプレックスした FASTQ データは、シーケンスアダプターを除去し、もしあれば MBC 配列を抽出する前処理をする必要があります。後述するアジレントの NGS ソフトウェアツールは、どちらも SureSelect XT HS2 DNA ライブラリに適した適切なリードの前処理ステップを含みます。
- ・ アジレントの Alissa Reporter ソフトウェアは、SureSelect でエンリッチしたライブラ

リの FASTQ ファイルからバリエーション探索処理までの完全なプロセスまで、さまざまなアプリケーションを提供します。詳細は 61 ページをご覧ください。

- ・ アジレントの Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) ソフトウェアモジュールは、生殖細胞系または体細胞系のバリエーション解析ワークフローに対して、ライブラリリード FASTQ ファイルを解析可能な BAM ファイルに処理するツールを提供します。詳細は 63 ページをご覧ください。
- ・ MBC 付きのライブラリを調製し、お持ちのシーケンス解析パイプラインが MBC を除去し Alissa Reporter や AGeNT ソフトウェアと互換性がない場合、64 ページに記載のようにアライメント前に各リードから最初の 5 塩基をトリミングまたはマスクします。

SureSelect XT HS2 DNA NGS ワークフローにおけるアジレント Alissa Reporter ソフトウェアの使用法

Alissa Reporter ソフトウェアは、アジレントの SureSelect アッセイ用の完全な FASTQ-to-Report ソリューションを提供し、NGS データを FASTQ フォーマットから VCF フォーマットに処理し、ヒト生殖細胞系列の SNV、InDel、CNV コールを報告します。

NOTE

現時点では、FFPE 由来またはほかの DNA サンプルの体細胞系列のバリエーションの検出解析は Alissa Reporter ソフトウェアは対応しておりません。体細胞系列のバリエーション解析を含め、サポート対応しているアプリケーションやワークフローなど、より最新の情報は Alissa Reporter ソフトウェアのサイトをご覧ください。

Alissa Reporter は、クラウドベースのマルチテナント型 SaaS (Software as a Service) 製品で、SureSelect XT HS2 DNA ライブラリのリードの統合された前処理 (アダプタートリミング、MBC 抽出および重複除去)、二次データ解析および内蔵のダッシュボードを使用した品質管理 (QC) 分析を提供します。より詳細な情報や購入についてはアジレントの Alissa Reporter ソフトウェアのサイトをご覧ください。

Alissa Reporter ソフトウェアでの解析前に、SureSelect XT HS2 DNA アッセイステップについて主に下記の点をご確認ください。

- ・ 目的のアプリケーションについて、ともに処理するサンプルの要件を決めてください。生殖細胞系列アプリケーションの CNV 解析では、次のサンプル要件が求められます。体細胞アプリケーション (2023 年夏予定) の腫瘍・正常解析では、腫瘍サンプルと matched/unmatched リファレンス (正常) は、同じランの SureSelect NGS ライブラリ作製で処理されている必要があります。現在のソフトウェアについては、Alissa Reporter ソフトウェアの Help をご覧ください。

5. NGS および解析のガイドライン

- Alissa Reporter は、同じラン内の非関連サンプルを共に解析し、ターゲットサンプルに対する参照シグナルを決定し、生殖細胞系列の CNV コールをします（生殖細胞系のアプリケーションでは、特定の参照サンプルは必要ありません）。Alissa Reporter で CNV コールの信頼できる参照シグナルを得るためには、少なくとも 3 サンプルできれば 8 またはそれ以上の関連性のないサンプルと一緒に解析することが必要です。X および Y 染色体の CNV 解析には、同じ性別の関連のないサンプルが必要です。ライブラリ調製によるばらつきを最小限にし最良の結果を得るために、CNV 解析には、同じ SureSelect ライブラリ調製のランおよび同じシーケンスランのサンプルを使用します。
- Alissa Reporter v1.1 以降では、デザイン済みまたはカスタム SureSelect プローブでエンリッチしたヒト DNA の生殖細胞系の解析アプリケーションに対応しています。SureSelect XT HS Human All Exon V7 または V8 プローブでエンリッチされたライブラリは、Alissa Reporter 内の *Human All Exon V7 Germline* または *Human All Exon V8 Germline* アプリケーションで解析します。デザイン済みのプローブ含め他のプローブでエンリッチしたライブラリは、Alissa Reporter の *Custom* アプリケーションで解析します。Alissa Reporter コンソールは、デザイン済みおよびカスタムプローブデザインの両方を SureDesign から取り込み、取り込んだ各デザインに対して新しい *Custom* アプリケーションを設定するツールがあります。
- 各サンプルの FASTQ ファイルをアップロードする際に、表 44 にあるようにアダプタータイプによって Application Chemistry メニューオプションを選択します。

表 44 アダプタータイプに応じた Alissa Reporter の Application Chemistry

HS2 Library Adaptor Type	Application Chemistry Selection Required
MBC-free	<i>XTHS2 (no MBC)*</i>
MBC-tagged	<i>XTHS2</i>

* Alissa Reporter v1.2 以降で対応

- マージされている・されていない FASTQ ファイルのどちらにも対応しています。BAM ファイルまたは FASTQ 以外のファイル形式のアップロードはサポートしていません。
- シーケンスファイルのパラメータ（ファイルサイズやリード数の限界など）を対応したソフトウェアのバージョンの Alissa Reporter ソフトウェアの Help または [リリースノート](#) から入手します。表 45 は主な FASTQ ファイルのパラメータです。

表 45 Alissa Reporter ソフトウェア v1.1 の FATSQ ファイルのパラメータ

Parameter	Value(s)	Notes
Maximum file size	50 GB/file	After lane merging, up to 400 GB/sample
Maximum files uploaded per Alissa Reporter run	768 files	—
Read number allowance per file before subsampling	150M reads for <i>Human All Exon V7 Germline</i> or <i>Human All Exon V8 Germline</i> application	>150M reads are randomly subsampled to 150M reads

SureSelect XT HS2 DNA NGS ワークフローにおけるアジレントの AGeNT の使用方法

アジレントの AGeNT ソフトウェアは、Java ベースのツールキットで SureSelect XT HS2 DNA ライブラリのリード処理ステップに使用します。AGeNT ツールは、バイオインフォマティクスの専門知識を持つユーザーが、内部解析パイプラインの構築・統合・保守・トラブルシューティングを行えるように設計されています。追加の情報やこのツールキットのダウンロードは AGeNT のサイトをご覧ください。

サンプルライブラリの調製に使用する SureSelect XT HS2 のアダプターのタイプによって、表 46 にまとめたように、サンプルに適したリード前処理ワークフローが決まります。AGeNT リード処理ツールの使用について、次に簡単まとめています。詳細については、SureSelect ライブラリに適したワークフローを網羅した AGeNT Best Practice ドキュメントのセクションをご覧ください。

表 46 アダプターに基づいた AGeNT のワークフロー選択

HS2 Library Adaptor Type	Suitable AGeNT Workflow
MBC-free	SureSelect XT
MBC-tagged	SureSelect XT HS2

バリエーション検出の前に、デマルチプレックスした SureSelect XT HS2 ライブラリ FASTQ データの前処理をします。AGeNT Trimmer モジュールを使用しシーケンスアダプターを除去し、もしあれば MBC 配列を抽出します。

トリミングしたリードは、BWA-MEM のような適切なツールを使用してアライメントします（必要に応じてアライメントされた BAM ファイルに MBC を追加します）。

アライメントとタグ付けが完了したら、AGeNT CReaK (Consensus Read Kit) ツールを使用してコンセンサスリードを生成し、重複をマークまたは除去します。得られた BAM ファイル

5. NGS および解析のガイドライン

はバリエーション探索を含む下流の解析に使用できます。

NOTE

CReaK は、AGeNT LocatIt tool の代わりに AGeNT version 3.0 で導入された重複除去のツールです。LocatIt と CReaK の詳細な比較については AGeNT のサイトをご覧ください。LocatIt は下位互換性のために利用可能ですが、CReaK が推奨のツールです。

NOTE

MBC 付きのライブラリで手元のシーケンス解析パイプラインが MBC を除去する場合、下流の解析に進む前に Read1 および Read2 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去します。

bcl2fastq を使用してデマルチプレックスする場合、MBC はベースマスク **N5Y*,I8,I8,N5Y*** (*はマスクした 5 塩基を除いた後の実際のリード長に置き換えてください。例えば、59 ページ表 43 にある 2 x 150 NGS の場合は **N5Y146,I8,I8,N5Y146** とします) を含めることでマスクできます。N と Y の合計は RunInfo.xml ファイルにあるリード長と一致する必要があります。

BCL Concert でデマルチプレックスする場合、MBC はサンプルシートのヘッダーに次の文字列を含めることでトリミングできます：
OverrideCycles,N5Y*,I8,I8,N5Y* (*はマスクした 5 塩基を除いた後の実際のリード長に置き換えてください。例えば、59 ページ表 43 にある 2 x 150 NGS の場合は **N5Y146,I8,I8,N5Y146** とします)。N と Y の合計は RunInfo.xml ファイルにあるリード長と一致する必要があります。

または、seqtk のような適切な処理ツールを使用してデマルチプレックスした FASTQ ファイルから最初の 5 塩基をトリミングします。AGeNT の Trimmer モジュールは、アダプター配列のトリミング中に MBC を除くためにも使用できます。アジレント製以外のアダプタートリミングツールは反対側のアダプター (図 8 参照) から MBC を除くことができず、アライメントの質に影響が出る可能性があります。

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 66

FFPE サンプルの品質確認 66

FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨 66

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 サンプルの場合に、プロトコルに変更を加える内容を表 47 に示します。

表 47 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 191919 ペ	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
DNA input for Library Preparation 1919 ペ	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity (see 表 9 and 表 10 211919 20)
DNA Shearing 211919 ペ	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)
Pre-capture PCR 331919 ペ	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing 671919 ペ	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity (see 表 48 and 表 48o表 671919 水)

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。

Δ ΔCq で品質を確認したサンプルの場合 :

Δ ΔCq DNA 分解スコアで品質を確認している場合は、表 48 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、Δ ΔCq 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 48 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 2x to 4x
>2	Increase sequencing allocation by 5x to 10x 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 49 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 49 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 2x to 4x
<3	Increase sequencing allocation by 5x to 10x or more

7. リファレンス

7. リファレンス

Reagent Kit に含まれている試薬 69

MBC 付きライブラリ調製の試薬キット 69

MBC なしのライブラリ調製試薬キット 70

各キットの内容 70

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア情報 72

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの配列 73

ストリップチューブおよびプレートのインデックスプライマーペアの位置 81

トラブルシュートガイド 84

クイックリファレンス 89

この章では、Reagent Kit に含まれている試薬、インデックス配列、トラブルシュート情報および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。

Reagent Kit に含まれている試薬

Fast-Hyb およびポストキャプチャプールの SureSelect XT HS2 DNA ライブラリ調製(+/- MBC)ワークフローでは、MBC 付きのライブラリは表 50、MBC なしのライブラリは表 51 にあるキットを使用します。各キットの詳細な内容は表 52 から表 56 に示します。

MBC 付きライブラリ調製の試薬キット

表 50 Fast-Hyb/ポストキャプチャプールの MBC 付き SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット

Purchased Kit Part Numbers	Included Component Kits	Storage Condition	Component Kit Part Number	
			16 Reaction Kits	96 Reaction Kits
Standard Component Modules				
16 Reaction Reagent Kit: G9981A (Index 1–16)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	–20°C	5500-0146	5500-0147
16 Reaction Starter Kit (see additional modules below): G9982A (Index 1–16)	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	–20°C	5191-5687 (Index Pairs 1–16)	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)
96 Reaction Reagent Kits: G9983A (Index 1–96) G9983B (Index 97–192) G9983C (Index 193–288) G9983D (Index 289–384)	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9685	5190-9687
96 Reaction Reagent Kits with bead modules: G9984A (Index 1–96) G9984B (Index 97–192) G9984C (Index 193–288) G9984D (Index 289–384)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	–20°C	5191-6686	5191-6688
Optional Component Modules				
See table footnotes for purchased kit part numbers that include each component kit	SureSelect DNA AMPure® XP Beads	+4°C	5191-5739*	5191-5740†
	SureSelect Streptavidin Beads	+4°C	5191-5741*	5191-5742†
	SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit	–20°C	5191-4079*	5191-4080‡

* 16 反応の SureSelect XT HS2 DNA Starter Kit (G9982A)には含まれています。

† 96 反応キット G9984A、G9984B、G9984C、G9984D に含まれています。

‡ 別途購入の必要があります。SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits には含まれていません。オプションの使用は本プロトコルでサポートされています。

7. リファレンス

MBC なしのライブラリ調製試薬キット

表 51 Fast-Hyb/ポストキャプチャプールの MBC なし SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット

Purchased Kit Part Numbers (96 Reaction Kits)	Included Component Kits	Storage Condition	Component Kit Part Number (96 Reaction Kits)
G9956A (Index 1–96) G9956B (Index 97–192) G9956C (Index 193–288) G9956D (Index 289–384)	SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM, MBC-Free (Pre PCR)	–20°C	5282-0052
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	–20°C	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)
G9987B	SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9687
	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	–20°C	5191-6688
	SureSelect Streptavidin Beads	+4°C	5191-5742
5191-4080*	SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit	–20°C	5191-4080

* 別途購入の必要があります。SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits には含まれていません。オプションの使用は本プロトコルでサポートされています。

各キットの内容

表 52 SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR) の内容

Kit Component	16 Reaction Kit (p/n 5500-0146)	96 Reaction Kit (p/n 5500-0147)
End Repair-A Tailing Enzyme Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
End Repair-A Tailing Buffer	tube with yellow cap	bottle
T4 DNA Ligase	tube with blue cap	tube with blue cap
Ligation Buffer	tube with purple cap	bottle
SureSelect XT HS2 Adaptor Oligo Mix	tube with white cap	tube with white cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap	tube with clear cap

表 53 SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit for ILM、MBC なし (Pre PCR) の内容

Kit Component	96 Reaction Kit (p/n 5282-0052)
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 MBC-Free Adaptor Oligo Mix	tube with black cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5x Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

表 54 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format	96 Reaction Kit Format
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)*	Blue 8-well strip tube (index pairs 1-8), AND White 8-well strip tube (index pairs 9-16)	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)

*インデックスペアの配列情報は 73～80 ページ、インデックスのプレート位置のマップは 82 ページを参照してください。

表 55 SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box1 (Post PCR)の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format (p/n 5190-9685)	96 Reaction Kit Format (p/n 5190-9687)
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle

表 56 SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box2 (Post PCR)の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format (p/n 5191-6686)	96 Reaction Kit Format (p/n 5191-6688)
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle	bottle
SureSelect XT HS2 Blocker Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect Post-Capture Primer Mix	tube with clear cap	tube with clear cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5x Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap	tube with clear cap

7. リファレンス

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 ライブラリを作製できます。1 つのプライマーペアは、8 ウェルストリップチューブ（16 反応キット、マップは 81 ページ参照）または 96 ウェルプレート（96 反応キット、マップは 82~83 ページ参照）の各ウェルで提供されます。各ウェルには、特定のフォワードおよびリバースプライマーの組み合わせの 1 回使用分が入ってます。

各プライマーのインデックス部分の塩基配列は 73 ページ表 58~80 ページ表 65 を参照してください。P7 インデックスは、対応するイルミナプラットフォームに共通なフォワード方向で記載されています。P5 インデックスは、プラットフォーム、シーケンスランセットアップおよび管理ツール（Local Run Manager や Instrument Run Setup など）に応じて、2 つの方向で示されています（フォワードおよびリバースの相補鎖）。イルミナのシーケンスプラットフォームやその P5 シーケンス方向は表 57 をご覧ください。正しい方向で P5 インデックスをサンプルシートやシーケンスセットアップに入力することが、デマルチプレックスの成功に重要です。イルミナのサポートドキュメントも併せて参照し、正しい P5 インデックスの方向を確認してください。

表 57 イルミナのプラットフォームに基づく P5 インデックス配列の方向

P5 Index Orientation	Platform
Forward	NovaSeq 6000 with v1.0 chemistry MiSeq HiSeq 2500
Reverse Complement*	NovaSeq 6000 with v1.5 chemistry NextSeq 500/550/1000/2000 HiSeq 3000/4000 iSeq 100 MiniSeq HiSeq X

*これらのプラットフォームで使用する一部のランのセットアップツールや管理ツールは、入力された P5 インデックス配列の逆相補鎖を自動的に生成します。お使いのパイプラインで使用するプラットフォームとツールの組み合わせについては、必ずイルミナのサポートドキュメントを参照して、ランのセットアップで入力する正しいインデックスの方向を決定してください。

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの配列

表 58 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1~ 48、オレンジの 96 ウェルプレートまたはストリップチューブ

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	CTTGACATA	GCACACAT	ATGTGTGC	44	D06	CGCTTCCA	TCGAACTG	CAGTTCTGA
21	E03	ATCCTCTT	CTTGACATA	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	GTAACCTG
24	H03	TGGCACCA	TGCTGCTC	GAGCAGCA	48	H06	CGCGCAAT	CAGAGCAG	CTGCTCTG

7. リファレンス

表 59 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 49 ~ 96、オレンジの 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
49	A07	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	A10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACTAT
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	TTCATTGC
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	TCCGTTAA	GCCAAGCT	AGCTTGGC	89	A12	GAACAAAG	ATACGAAG	CTTCGTAT
66	B09	GTGCAACG	TCCGTTAA	TTAACGGA	90	B12	AAGCCATC	GAGATTCA	TGAATCTC
67	C09	AGTAACGC	GTGCAACG	CGTTGCAC	91	C12	AACTCTTG	AAGCCATC	GATGGCTT
68	D09	CATAGCCA	AGTAACGC	GCGTTACT	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

表 60 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97 ~ 144、青い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
97	A01	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	A04	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	B01	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	B04	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	C01	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGT	123	C04	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D01	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D04	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	E01	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAAGT	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	TGAATTCG
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	TCTGCGAG	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	GAATCAGA	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

7. リファレンス

表 61 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 145 ~ 192、青い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	GTAATTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTCTG
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	CGTTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	B12	GAGTGCGT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	C09	CGTTAACG	CGTTTCGTC	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

表 62 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193 ~ 240、緑の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	TCTTGTGA
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	AAGGTAAT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GAATGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTAAT	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	GTTCCATA
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

7. リファレンス

表 63 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 241 ~ 288、緑の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	TCCGAAC	TCATACCG	CGGTATGA	272	H10	GTTGCAAG	ATAACGGC	GCCGTTAT
249	A08	AGAGAGAA	TCCGAAC	AGTTCGGA	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

表 64 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289 ~ 336、赤い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	ATGTCGAG	326	F05	AGGCTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGCTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAATCAC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAATCAC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GACTGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GACTGACG	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	TAACACG
311	G03	AACACCGA	CGATGTCG	CGACATCG	335	G06	AACGGTCA	CGTCAGAT	ATCTGACG
312	H03	GATCCATG	AACACCGA	TCGGTGTT	336	H06	GCCTTCAT	AACGGTCA	TGACCGTT

7. リファレンス

表 65 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 337 ~ 384、赤い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
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	ATGTCTTA	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	GTTCATTC	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCATTC	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	AACGTACT	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

ストリップチューブおよびプレートのインデックスプライマーペアの位置

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1~16（16 反応キットの場合）は下図のように 8 ウェルストリップチューブで納品されます。

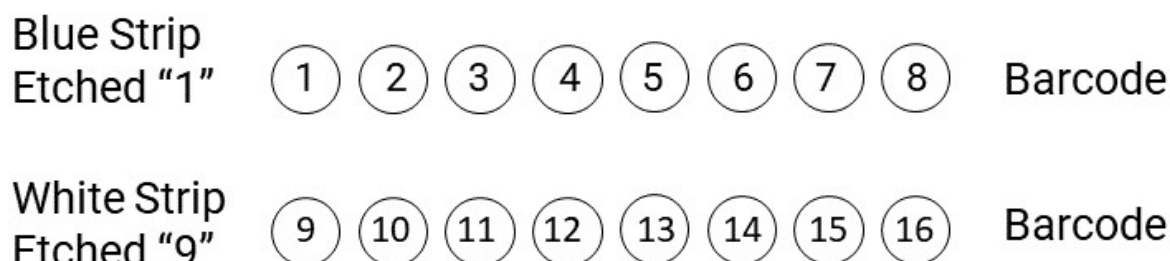


図 9 16 反応キットの SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)で提供されるストリップチューブの位置

インデックスプライマーペア 1~8 は青いストリップチューブで、キャップの端に「1」とある位置に近いウェルに 1 番目のペアが入っています。インデックスプライマーペア 9~16 は白いストリップチューブで、キャップの端に「9」とある位置に近いウェルに 9 番目のペアが入っています。

ライブラリ調製中に、ストリップチューブに入っているインデックスプライマーペアを使用する時は、溶液をピペティングする直前に使用するウェルのフویلシールをピペットチップで突き刺します。操作中に使用しないウェルのフویلシールが破けた場合は、ストリップチューブについている新しいフویلシールで未使用のウェルに蓋をしてください。新付属のフویلシールは、使用済みウェルの密閉にも使用でき、その後の使用時にインデックスペアの二次汚染を防ぐことができます。

96 反応キットの SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアのプレートマップは表 66 から表 69 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 66 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1 ~ 96、オレンジの 96 ウェルプレート
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 67 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97 ~ 192、青い 96 ウェルプレート
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	110	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 68 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193 ~ 288、緑の 96 ウェルプレート
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 69 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289 ~ 384、赤い 96 ウェルプレート
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での Proteinase K による分解反応中、20 ~ 30 分ごとに分解反応溶液を静かにピペティングしながら、溶液中の組織の塊の存在を確認しながらサンプルの溶解の状況を調べます。もし 56 °C1 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 μ L 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。

DNA サンプルの濃度が低く、酵素による断片化反応にたりない

- ✓ 標準の酵素による断片化プロトコルでは 10 ~ 200 ng の DNA が 7 μ L 必要で、最終的な断片化反応溶液は 10 μ L になります。希釈したサンプルの酵素による断片化は次の改変したプロトコルを使用し 20 μ L の反応容量で行います。
 - ・ プレートまたはストリップウェルに、サンプル DNA10 ~ 200 ng を 1X Low TE を用いて最終的に 17 μ L にします。
 - ・ 24 ページの表 15 にある Fragmentation マスターミックスを調製します。
 - ・ 各 DNA サンプルウェルに 3 μ L のマスターミックスを加え、24 ページにあるように混合しスピンドウンします。
 - ・ 23 ページの表 13 にあるサーマルサイクラープログラムを、37°Cの長さを下記表のようにしてランします。

NGS read length	High-quality DNA samples	FFPE DNA samples
2 x100 reads	25 minutes	25 minutes
2 x150 reads	15 minutes	25 minutes

キャプチャ前のライブラリの収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペティング・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 (28 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。
- ✓ AMPure XP ビーズの精製ステップからの収量が最適ではない可能性があります。以下の要因を考慮してください。
 - ・ プロトコルに記載されているビーズと試薬の取り扱い手順をすべて守ってください。特にビーズを使用前に少なくとも 30 分室温で平衡化させ、各精製手順で新鮮な 70 % エタノール (使用当日に調製) を使用してください。
 - ・ サンプル溶出直前のステップで AMPure XP ビーズが過度に乾燥していないことを確認してください。ビーズを 37°C 2 分で乾燥している場合は、室温 5 分で乾燥することを検討してください。
 - ・ 溶出のためのインキュベーション時間を延長することで (最長 10 分)、特に長い DNA 断片の収量が改善することがあります。

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。

断片化 DNA の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。

7. リファレンス

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、インプットしたサンプル中のターゲット断片長より短い DNA の影響により、断片化後のターゲットサイズよりも短いものが含まれることがあります。19 ページの DNA の質のガイドラインに従ってください。
- ✓ 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、35 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。

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。38 ページのサンプル泳動図と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、次のターゲットエンリッチのステップに進んでも問題ありません。それ以上にアダプターダイマーが含まれている場合は、キャプチャ前のライブラリの収量を低下させる可能性があります。アダプターダイマーが多く存在する場合は、アダプターライゲーションの工程が 30 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 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。
- ✓ MBC なしの RNA シーケンスライブラリを調製する場合、このキットに含まれる MBC-Free Adaptor Oligo mix は、27 ページにあるように使用前に 5 倍に希釈してください。希釈せずにアダプター溶液を使用すると、cDNA ライブラリのアダプターによるダイマーが増える可能性があります。

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プローブに要因がある可能性があります。使用している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。Probe 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、プローブを含む溶液は長時間室温に置かないでください。
- ✓ AMPure XP ビーズの精製ステップからの収量が最適ではない可能性があります。以下の要因を考慮してください。
 - プロトコルに記載されているビーズと試薬の取り扱い手順をすべて守ってください。特にビーズを使用前に少なくとも 30 分室温で平衡化させ、各精製手順で新鮮な 70 % エタノール（使用当日に調製）を使用してください。
 - サンプル溶出直前のステップで AMPure XP ビーズが過度に乾燥していないことを

確認してください (50 ページの step 12)。ビーズを 37°C 2 分で乾燥している場合は、室温 5 分で乾燥することを検討してください。

- ・ 溶出のためのインキュベーション時間を延長することで(最長 10 分)、特に長い DNA 断片の収量が改善することがあります。

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、49 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を確認してください (46 ページ参照)。0.2 mL の液量を効率的に熱することのできるブロックに対応したサーマルサイクラを選び、洗浄バッファを入れたプラスチックウェアがサーマルブロックのウェルに完全に収まっていることを確認し、プレウォーム中にブロックの上に見える溶液が最小限であることを確認してください。
 - ・ 洗浄中はサンプルが 70 °C で保たれていること (47 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 (47 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 (44 ページのステップ 8 と 9) でサンプルの温度を 65 °C に保てるように、ボルテックスとチューブやプレートのスピンドアウンのための遠心装置は、極力サーマルサイクラの近くにおいてください。

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

- ✓ AT-ドロップアウトが高いことは、ハイブリダイゼーションの条件が厳し過ぎて、AT-rich なターゲットを求められるカバレッジレベルが得られなかったことが考えられます。
 - ・ SureSelect XT HS Human All Exon V8 プローブまたは SureSelect XT HS Clinical Research Exome V4 を使用し (65 °C 1 時間のセグメントを含む) 42 ページの表 29 のハイブリダイゼーションプログラムでターゲットエンリッチしたライブラリは、65 °C 1 時間のセグメントを含まずに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 30 参照)、再度低い stringency の条件でハイブリダイゼーションを行

7. リファレンス

います。

- ✓ XT プラットフォームでデザインされたカスタムプローブの場合、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。

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 19~54 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 19 ページ and 20 ページ . Mechanically shear DNA using Covaris with shearing conditions on 22 ページ OR enzymatically fragment DNA using SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit with protocol on 23 ページ . Either method yields fragmented DNA in final sample volume of 50 µL.
Prepare Ligation master mix	Per 8 reactions: 207 µL Ligation Buffer + 18 µL T4 DNA Ligase Per 24 reactions: 598 µL Ligation Buffer + 52 µL T4 DNA Ligase Keep at room temperature 30–45 min before use
Prepare End-Repair/dA-Tailing master mix	Per 8 reactions: 144 µL End Repair-A Tailing Buffer + 36 µL End Repair-A Tailing Enzyme Mix Per 24 reactions: 416 µL End Repair-A Tailing Buffer + 104 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 OR 5 µL SureSelect XT HS2 MBC-Free 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 8 reactions: 90 µL 5× Herculanase II Reaction Buffer with dNTPs + 9 µL Herculanase II Fusion DNA Polymerase Per 24 reactions: 260 µL 5× Herculanase II Reaction Buffer with dNTPs + 26 µL Herculanase 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 33 ページ
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
Hybridization/Capture	
Program thermal cycler	Input the appropriate thermal cycler program 4233 ページ and pause program
Prep DNA in hyb plate	Adjust 500–1000 ng purified prepared library to 12 µL volume with nuclease-free H ₂ O
Run pre-hybridization blocking protocol	12 µL library DNA + 5 µL SureSelect XT HS2 Blocker Mix Run paused thermal cycler program segments 1 through 3 Keep at 65°C hold in segment 3 until Hyb Mix (described below) added

7. リファレンス

Step	Summary of Conditions
Prepare Hyb Mix	Prepare 25% RNase Block dilution, then prepare appropriate Probe Hyb Mix below: Probes ≥ 3 Mb: 2 μ L 25% RNase Block + 5 μ L Probe + 6 μ L SureSelect Fast Hybridization Buffer Probes < 3 Mb: 2 μ L 25% RNase Block + 2 μ L Probe + 3 μ L nuclease-free H ₂ O + 6 μ L SureSelect Fast Hybridization Buffer
Run the hybridization	With cyclor held in segment 3 and samples retained in cyclor, add 13 μ L Probe Hyb Mix to wells Resume the thermal cyclor program, completing the remaining hybridization segment(s) and final 65°C or 21°C hold segment
Prepare streptavidin beads	Wash 50 μ L Streptavidin T1 beads 3 $\times$ in 200 μ L SureSelect Binding Buffer
Capture hybridized libraries	Add hybridized samples (~30 μ L) to washed streptavidin beads (200 μ L) Incubate 30 min at RT with vigorous shaking (1400-1900 rpm) During incubation, pre-warm 6 $\times$ 200 μ L 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 $\times$ with 200 μ L SureSelect Wash Buffer 1 at RT Wash beads 6 $\times$ with 200 μ L pre-warmed SureSelect Wash Buffer 2 (5 minutes at 70°C per wash) Resuspend washed beads in 25 μ L nuclease-free H ₂ O
Post-capture amplification	
Prepare PCR master mix	Per 8 reactions: 117 μ L nuclease-free H ₂ O + 90 μ L 5 $\times$ Herculase II Reaction Buffer with dNTPs + 9 μ L Herculase II Fusion DNA Polymerase + 9 μ L SureSelect Post-Capture Primer Mix Per 24 reactions: 338 μ L nuclease-free H ₂ O + 260 μ L 5 $\times$ Herculase II Reaction Buffer with dNTPs + 26 μ L Herculase II Fusion DNA Polymerase + 26 μ L SureSelect Post-Capture Primer Mix Keep on ice
Amplify the bead-bound captured libraries	25 μ L DNA bead suspension + 25 μ L PCR master mix Amplify in thermal cyclor using conditions on 4833 ページ
Purify amplified DNA	Remove streptavidin beads using magnetic stand; retain supernatant 50 μ L amplified DNA + 50 μ L AMPure XP bead suspension Elute DNA in 25 μ L Low TE
Quantify and qualify DNA	Analyze quantity and quality using TapeStation, Bioanalyzer, or Fragment Analyzer System

G200303

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。