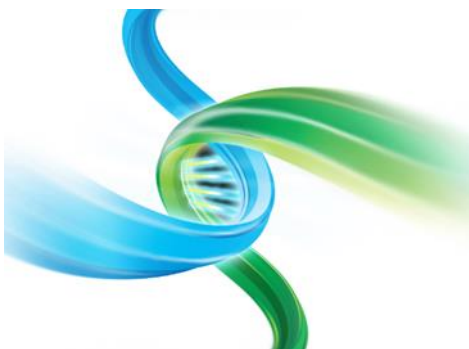
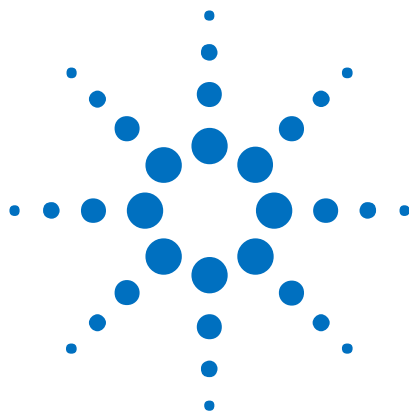




アジレント
SureSelect XT HS2 RNA
システム
プレキャプチャプール

**Strand-Specific RNA ライブラリ調製
イルミナペアエンドマルチプレックス
シーケンス対応キット**

和文プロトコル

Protocol Version A1, September 2020 対応
[2021 年 7 月版 和文]

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

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2021

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

確認

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

保証

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

技術ライセンス

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

制限付き権利の説明文

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

ご購入者への通知

本製品は、Bio-Rad Laboratories と Agilent Technologies, Inc. との間の契約に基づいて提供されており、本製品の製造、使用、販売または輸入は、Bio-Rad Laboratories 社が所有する U.S. Pat. No. 6,627,424 および EP Pat. No. 1 283 875 81 の対象となります。本製品の購入により、ご購入者には、ご購入頂いた量の本製品および本製品の成分を PCR (ただし、リアルタイム PCR は除く) においては研究分野 (法医学、動物実験、食品検査を含む、すべての応用研究分野を含む) で使用し、またリアルタイム PCR においては診断および予後分野で使用する譲渡不可能な権利が与えられます。本製品を、す

すべての応用研究分野(法医学、動物実験、食品検査を含むがこれらに限定されない)を含む研究分野においてリアルタイム PCR に使用する権利は与えられていません。

限定使用ラベルライセンス: 本製品とその使用は、New England Biolabs, Inc.に独占的にライセンスされ、Agilent Technologies にサブライセンスされた、Max Planck Gesellschaft が所有する 1 つ以上の発行済みおよび/または保留中の米国および外国の特許出願の対象です。Agilent Technologies, Inc.、その関連会社またはそれらの正規の販売店もしくは再販業者からの本製品の購入により、ご購入頂いた量の本製品および本製品の成分を購入者(購入者が学術団体であるか営利団体であるかを問わない)が実施する研究において使用する譲渡不可能な権利が購入者には与えられます。本製品の購入は、本製品の製造を目的とした前述の特許または特許出願のクレームに基づくライセンスを付与するものではありません。購入者は、本製品またはその成分を第三者に販売またはその他の方法で譲渡したり、次の商業目的で本製品を使用したりすることはできません。(1) 製造において本製品またはその成分を使用すること、または(2) ヒトまたは動物における治療または予防目的で本製品またはその成分を使用すること。

CAUTION

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

本プロトコルについて

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

本日本語プロトコルは、英語版の

SureSelect XT HS2 RNA System with Pre-Capture Pooling

Strand-Specific RNA Library Preparation and Target Enrichment for the Illumina Platform Version A1, September 2020 [G9993-90000] に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント SureSelect XT HS2 RNA Reagents を用い、イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応したライブラリを調製し、プールした後にトランスクリプト中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。SureSelect XT HS2 RNA Reagent Kit と本プロトコルは、ターゲット領域をキャプチャする前に、分子バーコードが付加されたインデックスライブラリを調

製する内容で、イルミナプラットフォームでの高感度次世代シーケンス(NGS)を実現しています。

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

本資料は、SureSelect XT HS2 RNA システムを使用して、イルミナ社のターゲットエンリッチしたペアエンドマルチプレックスシーケンシングライブラリを作製するためのプロトコルです。

1. はじめに

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

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

この章では、RNA サンプルを準備・定量し断片化を行い、cDNA に変換するステップを説明しています。

3. ライブラリ調製

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

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

この章では、調製した cDNA ライブラリと SureSelect や ClearSeq オリゴキャプチャライブラリをハイブリダイゼーションしキャプチャする手順について説明しています。

5. キャプチャ後のマルチプレックスシーケンスのためのサンプル調製

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

6. リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬キットの構成品やインデックスの配列などの参照情報を記載しています。

Version A1 の追加項目

- ・シーケンサプラットフォームごとの P5 インデックスの追加とインデックスペアの配列表を更新し、ウェル位置を修正
- ・表 39 のサポート情報を更新
- ・表 13 の融解方法を更新

内容

1. はじめに	7
ワークフロー概要	8
操作に関する注意	9
安全に関する注意	9
実験に必要な試薬・器具	10
オプションの消耗品	13
2. インプット RNA の準備と cDNA 化	14
Step 1A. FFPE 由来 RNA の準備と質の評価	16
Step 1B. 質のいい RNA サンプルの準備と断片化	18
Step 2. First strand cDNA 合成	20
Step 3. Second strand cDNA 合成	21
Step 4. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製	22
3. ライブラリ調製	24
Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製	26
Step 2. cDNA 3'末端の修復と dA 付加	27
Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション	29
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製	30
Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅	31
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製	33
Step 7. ライブラリの定量とサイズの確認	34
4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ	36
Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付加 cDNA のプール	37
Step 2. cDNA ライブラリとプローブのハイブリダイズ	38
Step 3. ストレプトアビジンビーズの準備	42
Step 4. ストレプトアビジンビーズによるハイブリダイズ DNA のキャプチャ	43
5. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製	45
Step 1. キャプチャしたライブラリの増幅	46
Step 2. 増幅したキャプチャライブラリの AMPure XP ビーズによる精製	49
Step 3. シークエンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	50
Step 4. オプション: マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール	52
Step 5. シークエンスサンプルの準備	54
Step 6. シークエンスの開始とデータ解析	56
6. リファレンス	61
キット内容	62
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報	64
トラブルシューティングガイド	75
Quick Reference Protocol	77



1. はじめに

ワークフロー概要.....	8
操作に関する注意点	9
安全に関する注意	9
実験に必要な試薬・器具.....	10
オプションの消耗品	13

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

本プロトコルに記載されている通りに SureSelect 試薬を用いた場合のみ、保証の対象となり技術サポートが適用されます点、ご了承ください。

1. はじめに

ワークフロー概要

SureSelect XT HS2 RNA のワークフローを図 1 に示します。

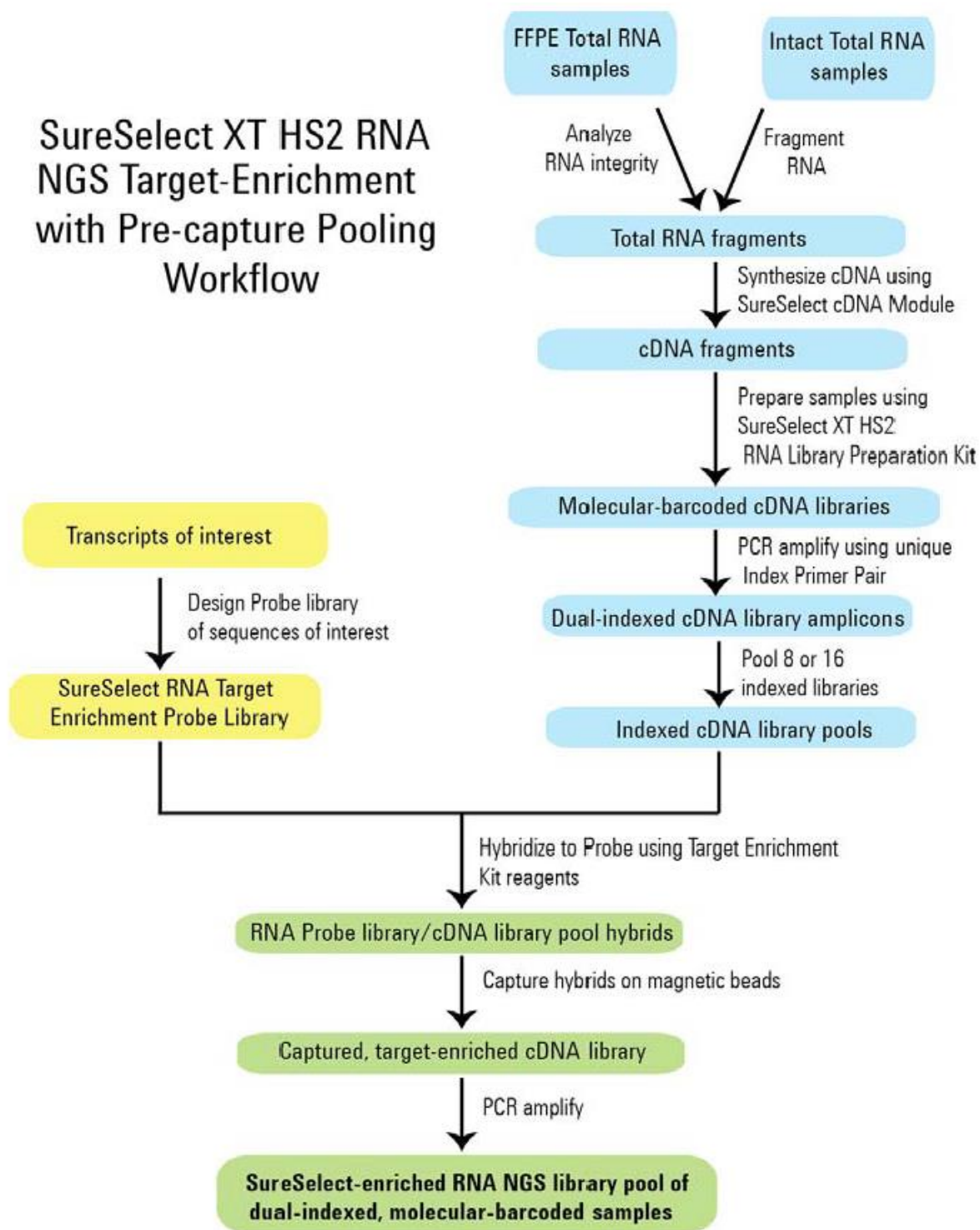


図 1 ターゲットエンリッチメント RNA シーケンスサンプル調製のワークフロー

操作に関する注意点

- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用ください。
- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物や RNase 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。日常的にコンタミネーションのリスクがある場所を 10% bleach solution やその相当品により清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ Biosafety Level 1 (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で保存する場合は、サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。

安全に関する注意**CAUTION**

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

1. はじめに

実験に必要な試薬・器具

この章では、SureSelect XT HS2 RNA プロトコルに必要な試薬や器具を表にまとめています。Library Preparation KitとTarget Enrichment Kitは表 1 を、ターゲットエンリッチメントのプレキャプチャプール用のキャプチャプローブは表 2 から選択してください。その他に必要な試薬や器具は表 3 から表 6 を参照にしてください。

表 1 プレキャプチャプールの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット

SureSelect XT HS2 RNA試薬キット (Library Preparation KitとTarget Enrichment Kitの両方が必要です。)					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM. 96 反応分 *	Agilent	G9993A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
		G9993B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9993C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9993D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
SureSelect XT HS2 RNA Target Enrichment Kit, 12 Hybs †	Agilent	G9994A	指定	12ハイブリダイゼーション分	

* 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。

† 12ハイブリダイゼーション分のTarget Enrichment kitは、各プローブの推奨に従い1プールあたり8サンプルまたは16サンプルでプールした場合、96サンプルのターゲットエンリッチメントに対応しています。

表 2 キャプチャプローブ

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

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

† 6ハイブリダイゼーション分のプローブは、16サンプル/プールの推奨構成で96サンプル(16サンプル/ハイブリダイゼーションを6回)に対応しています。6ハイブリダイゼーション/ランのセットアップで1反応分の試薬が含まれます。30ハイブリダイゼーション分のプローブは、16サンプル/プールの推奨構成で480サンプル(16サンプル/ハイブリダイゼーションを30回)に対応しています。6ハイブリダイゼーション/ランのセットアップで5反応分の試薬が含まれます。

‡ 12ハイブリダイゼーション分のプローブは、8サンプル/プールの推奨構成で96サンプル(8サンプル/ハイブリダイゼーションを12回)に対応しています。6ハイブリダイゼーション/ランで2反応分の試薬が含まれます。

表 3 必要な試薬

その他の試薬(すべてのサンプルタイプ)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
AMPure® XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter Genomics	A63880	指定	5 mL	大容量タイプ(60mL [A63881], 450mL [A63882])もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	65601	指定	2 mL	大容量タイプ(10mL [65602], 50mL [65604D]) もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと
QPCR Human Reference Total RNA	Agilent	750500	指定 (オプション)		コントロールRNAとして使用できます。

表 4 必要な消耗品・機器

必要な機器、消耗品類					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
サーマルサイクラー (96ウェル、0.2 mlブロック)			相当		HotTop使用 サンプル量が0.2 ml を超えるステップがありま す。0.25 ml 以上入れられるプラスチックウェ アに対応したサーマルサイクラーを使用してく ださい。
サーマルサイクラーに適したプラスチックウェア: ・96-well tube plates または8-well strip tubes ・ドーム型のcap strips			相当		
低吸着チューブ ・1.5 mL ・0.5 mL	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ない低吸着タイプ(RNase、 DNaseおよびDNAフリー)を使用してください。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンダウン用。卓上遠心機で も可能。(例: 日本ミリポア チビタンII)
96ウェルプレートもしくは8 strip tubes 遠心機	KUBOTA または ワケンビー テック		相当		96ウェルプレートもしくは8 strip tubesの スピンダウン用 ・96ウェルプレート用: PlateSpin II (KUBOTA) ・8 strip tubes用: 卓上遠心機 プチチェンジ (ワケンビーテック)
MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003428000	相当		ストレプトアビジンビーズ溶液がウェル内によく 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。
低容量分光光度計	Thermo Fisher Scientific	ND-2000	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。
濃縮遠心機	Eppendorf	5417C	相当		PCRプレート用ローター(A-2-VC)と合わせて 使用します。プレプールのサンプルをPCRプ レートまたは8strip tube(1.5 mL tube/0.5 mL tubeも可)で濃縮遠心します。
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	相当		
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、 エアロゾルブロックフィルター付き					
ボルテックスミキサ					
アイスバケツ					
パウダーフリー手袋					
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。

1. はじめに

CAUTION

サンプル量が 0.2 ml を超えるステップがあります。選択したサーマルサイクラで利用できるプラスチック製品が各ウェル 0.25 ml 以上入るかご確認ください。

表 5 核酸の QC プラットフォーム – いずれかの装置を選んでください。

ライブラリQC用 (お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用・バイオアナライザ用・Fragment Analyzer用の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
RNA/DNA解析用の電気泳動装置 (いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。)					
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991BA/ G2992AA	指定		RNAの定性に使用することができます。 DV200を計測するにはTapeStation Analysis software A.02.02以降が必要です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		RNAの定性に使用することができます。 DV200を計測するにはExpert Control Software ver B.02.08以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer	Agilent	M5310AA/ M5311AA/ M5312AA	指定		
Agilent 4150/ 4200 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation RNA ScreenTape	Agilent	5067-5576	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation RNA ScreenTape Sample buffer	Agilent	5067-5577	指定	最大 112サンプル分	
Agilent TapeStation RNA ScreenTape Ladder	Agilent	5067-5578	指定	10 ul	1ul/回
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape Sample buffer	Agilent	5067-5580	指定	最大 112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder	Agilent	5067-5581	指定	10 ul	1ul/回
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	最大 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	最大 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 RNA 6000 Pico kit	Agilent	5067-1513	指定	25ラン分	1ランで最大11サンプル測定できます。
Agilent RNA 6000 Nano kit	Agilent	5067-1511	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプル測定できます。
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプル測定できます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	10ラン分	1ランで最大11サンプル測定できます。Expert Control Software B.02.07以降が必要です。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer消耗品					
RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-471-0500	指定		
HS RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-472-0500	指定		
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		

オプションの消耗品

表 6 オプションの消耗品

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Tween 20	Sigma Aldrich	P9416-50ML	相当	50 mL	シーケンスライブラリの保存のために 使用します。
Optical Caps, 8x strip (flat)			相当		サーマルサイクラーを使用しないステップで チューブや96ウェルプレートに蓋をする際に使 用します。
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。
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		

2. インプット RNA の準備と cDNA 化



2. インプット RNA の準備と cDNA 化

Step 1A. FFPE 由来 RNA の準備と質の評価	16
Step 1B. 質のいい RNA サンプルの準備と断片化	18
Step 2. First strand cDNA 合成	20
Step 3. Second strand cDNA 合成	21
Step 4. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製	22

この章では、必要に応じて RNA 断片化を含むインプット RNA の準備と、シーケン斯拉イブラリ調製とターゲットエンリッチメントの前に断片化 RNA をストランド特異性を保った cDNA へ変換するステップを説明します。

本プロトコルは、新鮮なまたは新鮮凍結のサンプル由来の質のいい RNA に加え、FFPE サンプル由来の質の低い RNA にも対応しています。FFPE 由来 RNA は 16 ページの **Step 1A. FFPE 由来 RNA の準備と質の評価** から開始してください。質のいい RNA サンプルは 18 ページの **Step 1B. 質のいい RNA サンプルの準備と断片化** から開始してください。

RNA シーケン斯拉イブラリの調製には、NGS ワークフローに適した長さの RNA 断片が必要です。この章では、質のいい RNA サンプルを、金属イオンを含む 2x Priming Buffer を用いて指定の温度で処理することで化学的に断片化します。FFPE 由来サンプルは、2x Priming Buffer と混合しますが、過剰な断片化を防ぐために氷上に保ちます。

この章のプロトコルは、質のいい RNA および FFPE 由来 RNA のどちらも、2 x 100 bp または 2 x 150 bp のリード長のシーケンシングに対応しています。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

このステップでは表 7 の試薬を使用します。使用前に(Where Used を参照)、各試薬を表 7 に記載の方法で融解し混合してください。22 ページのステップの使用準備のため、冷蔵保存の AMPure XP ビーズを室温に移し、30 分以上おきます。**AMPure XP ビーズは冷凍しないでください。**

表 7 このステップで使用する前に融解する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
2X Priming Buffer (tube with purple cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	17 ページ (FFPE RNA) OR 18 ページ (intact RNA)
First Strand Master Mix (amber tube with amber cap)*	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice for 30 minutes then keep on ice	Vortexing	20 ページ
Second Strand Enzyme Mix (bottle)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	21 ページ
Second Strand Oligo Mix (tube with yellow cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	21 ページ

* First Strand Master Mix はアクチノマイシン D を含んでおり、特別な準備が不要で使えます。
光の暴露から守るため、提供されている琥珀色のチューブから移し替えないでください。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

Step 1A. FFPE 由来 RNA の準備と質の評価

この章は FFPE 由来 RNA サンプル向けです。質のいい (FFPE 由来ではない) RNA サンプルは、18 ページの **Step 1B. 質のいい RNA サンプルの準備と断片化** を参照してください。

各 FFPE サンプルから RNA を抽出します。ライブラリ調製には、10 ul のヌクレアーゼフリー水に 10 ~ 200 ng の FFPE 由来 total RNA が必要です。

アジレントの QPCR Human Reference Total RNA (型番 750500) のような、質の高いコントロール RNA サンプルのライブラリ調製を並行して行うようにしてください。特に初めて本プロトコルでライブラリ調製をする場合は、すべてのステップが滞りなく進められたか確認するために使用を強く推奨します。このコントロールを使用することで、RNA サンプルに関連するパフォーマンスの問題と他の要因を区別し、必要なトラブルシューティングに役立ちます。

ライブラリ調製プロトコルを始める前に、ワークフロー中の最適な反応条件を決めるために各サンプルの初期の質を評価します。以下のステップで各 FFPE 由来 total RNA を評価します。

1. 必要量が少量の分光光度計を使用して、サンプルの 260 nm、280 nm および 230 nm の吸光度を測定します。サンプルの RNA 濃度、260 / 280 および 260 / 230 の吸光度比を求めます。
質の高い RNA サンプルは、両方の比が約 1.8 から 2.0 の値になります。2.0 より極端に値が離れている場合は、有機物または無機物の混入を示しています。その場合には再精製が必要、または RNA ターゲットエンリッチメントアプリケーションには不向きな場合があります。
2. 表 8 の RNA を評価するシステムのいずれか 1 つを使用してスタート RNA サンプルのサンプル分布を評価します。上記ステップ 1 の RNA 濃度に基づいて、サンプルに適したアッセイを選んでください。
各システムの解析ソフトで、DV200 (サンプルに含まれる 200 nt 以上の RNA の割合) を測定します。効率的に cDNA ライブラリへ変換するには、RNA 分子は 200 nt 以上である必要があります。

表 8 RNA を評価するシステム

Analysis Instrument	RNA Qualification Assay	Analysis to Perform
4200/4150 TapeStation	RNA ScreenTape or High Sensitivity RNA ScreenTape	Region analysis using TapeStation Analysis Software
2100 Bioanalyzer	RNA 6000 Pico Chip or NanoChip	Smear/Region analysis using 2100 Expert Software
5200 Fragment Analyzer	RNA Kit (15NT) or HS RNA Kit (15NT)	Analysis using ProSize Data Analysis Software

NOTE

本プロトコルでは、FFPE 由来 RNA の質を RNA Integrity Number (RIN) で評価することは推奨されていません。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

3. 表 9 を参照し、サンプルに含まれる 200 nt 以上の RNA の割合から各 RNA サンプルを評価します。

表 9 RNA サイズに基づいた FFPE 由来 RNA の分類

Grade	DV200	Recommended input amount	Minimum input amount
Good FFPE RNA	>50%	200 ng	10 ng
Poor FFPE RNA	20% to 50%	200 ng	50 ng*
Inapplicable FFPE RNA	<20%	Not recommended for further processing	

* 最適な結果を得るために、Poor FFPE RNA サンプルは最低でも 50 ng の RNA からライブラリを調製してください。10 ~ 50 ng の Poor FFPE RNA サンプルでライブラリ調製を行うと、収量や NGS パフォーマンスに悪影響が出る可能性があります。

4. 10 ~ 200 ng の FFPE 由来 total RNA をヌクレアーゼフリー水で 10 ul に調製し、サーマルサイクラに適したストリップチューブか PCR プレートの各ウェルに分注します。
Poor FFPE RNA サンプルは 50 ng 以上の RNA が必要です。
5. 各サンプルウェルに 10 ul の 2x Priming Buffer を添加します。
6. 吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。軽くスピンドウンして溶液を集め、RNA サンプルを氷上におきます。

NOTE

非常に分解している FFPE サンプルを含め、すべてのサンプルに cDNA 合成のためのランダムプライマーを含む 2x Priming Buffer を添加する必要があります。FFPE 由来 RNA サンプルはこのバッファで断片化する高い温度でのインキュベーションは行いません。

7. すぐに 20 ページの **Step 2. First strand cDNA 合成**に進みます。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

Step 1B. 質のいい RNA サンプルの準備と断片化

この章は、新鮮なサンプルまたは新鮮凍結サンプル由来の質のいい RNA サンプルが対象です。FFPE 由来 RNA サンプルは、16 ページの **Step 1A. FFPE 由来 RNA の準備と質の評価**を参照してください。

アジレントの QPCR Human Reference Total RNA (型番 750500) のような、質の高いコントロール RNA サンプルのライブラリ調製を並行して行うようにしてください。特に初めて本プロトコルでライブラリ調製をする場合は、すべてのステップが滞りなく進められたか確認するために使用を強く推奨します。このコントロールを使用することで、RNA サンプルに関連するパフォーマンスの問題と他の要因を区別し、必要なトラブルシューティングに役立ちます。

このステップで使用する 2x Priming Buffer には断片化に必要な試薬と、続けて行う cDNA 合成のプライマーが含まれています。この章の断片化条件は 2 x 100 bp または 2 x 150 bp のリード長のシーケンシングに対応しています。

1. 各サンプルから total RNA を抽出します。10 ~ 200 ng の質のいい total RNA をヌクレアーゼフリー水で 10 ul に調製します。
必要量が少量の分光光度計と 12 ページの
表 5 にある RNA を評価するプラットフォームの 1 つを使用して、RNA の濃度と質を評価します。
2. 表 10 に従い、サーマルサイクラのプログラムを設定します。開始後すぐにプログラムを一時停止し、サンプルを 19 ページのステップ 6 でセットするまで停止しておきます。

表 10 質のいい RNA サンプルを断片化するためのサーマルサイクラプログラム※

Step	Temperature	Time
Step 1	94°C	4 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 20 ul に設定します。

NOTE

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

3. ヌクレアーゼフリー水で 10 ul に調製した 10 ~ 200 ng の total RNA をサーマルサイクラに適したストリップチューブまたは PCR プレーットの各ウェルに分注します。
4. 10 ul の 2x Priming Buffer を各サンプルウェルに加えます。
5. 吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペッティングでよく混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。軽くスピンドウンして溶液を集めます。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

6. サンプルをサーマルサイクラにセットし、RNA 断片化のための表 10 のサーマルプログラムを再開します。
7. 表 10 のサーマルプログラムが、4 °C Hold のステップになったら、断片化された RNA サンプルのストリップチューブまたは PCR プレートから取り出し、氷上におきます。すぐに 20 ページの **Step 2. First strand cDNA 合成**に進みます。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

Step 2. First strand cDNA 合成

CAUTION

このステップで使用する First Strand Master Mix はとても粘性が高い試薬です。
使用前と、他の試薬に混合した後は高速のボルテックスで 5 秒間、徹底的に混合し
ます。この試薬はピペティングでの混合では不十分です。

First Strand Master Mix はアクチノマイシン D が含まれております。追加のアクチノ
マイシン D は必要ありません。

1. 表 11 に従ってサーマルサイクラのプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止します。

表 11 First strand cDNA 合成のためのサーマルサイクラプログラム※

Step	Temperature	Time
Step 1	25°C	10 minutes
Step 2	37°C	40 minutes
Step 3	4°C	Hold

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 28 ul に設定します。

2. 溶液を均一にするために、融解した First Strand Master Mix を高速のボルテックスで 5 秒間、徹底的に混合します。
3. 各 RNA サンプルウェルに 8.5 ul の First Strand Master Mix を加えます。
4. 吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。軽くスピンドウンして溶液を集めます。
5. サンプルをサーマルサイクラにセットし、表 11 のプログラムを再開します。

Step 3. Second strand cDNA 合成

CAUTION

このステップで使用する Second Strand Enzyme Mix はとても粘性が高い試薬です。使用前と、他の試薬に混合した後は高速のボルテックスで 5 秒間、徹底的に混合します。この試薬はピペティングでの混合では不十分です。

1. 表 11 のサーマルプログラムで 4 °C Hold のステップが始まったらサンプルを氷上に移します。
2. 表 12 のサーマルサイクラプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 7 でサンプルをセットするまで停止します。

表 12 Second strand cDNA 合成のサーマルサイクラプログラム※

Step	Temperature	Time
Step 1	16°C	60 minutes
Step 2	4°C	Hold

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 58 ul に設定します。

3. 溶液を均一にするために、融解した Second Strand Enzyme Mix と Second Strand Oligo Mix を高速のボルテックスで 5 秒間混合します。
4. 各サンプルウェルに 25 ul の Second Strand Enzyme Mix を加え、氷上においておきます。
5. 各サンプルウェルに 5 ul の Second Strand Oligo Mix を加え、氷上においておきます。反応液の総量は 58.5 ul になります。
6. 吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。軽くスピンドウンして溶液を集めます。
7. PCR 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セットし、表 12 のプログラムを再開します。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

Step 4. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 9 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 ul（と余剰分）を調製します。

NOTE

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。新鮮な 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）の工程で 1 サンプルあたり計 1.2 ml、ターゲットエンリッチメントのステップではさらに 1 サンプルあたり計 0.4 ml 必要です。

3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. サンプルの入った PCR プレートまたはストリップチューブを室温に移し、均一にした 105 ul のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。
5. ピペッティングで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5 ~ 10 秒高速でボルテックスすることで混合します。ビーズがチューブの側面やふたに跳ね上がったなら、ビーズがペレット状にならない程度に軽くスピンドウンします。
6. サンプルを室温で 5 分インキュベートします。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます（約 2 ~ 5 分）。
8. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの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。
9. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 ul 加えます。
10. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
11. ステップ 9 とステップ 10 をもう一度繰り返し、計 2 回洗浄します。
12. ストリップキャップでふたをし、残存のエタノールを集めるために軽くスピンドウンします。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
13. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします（最大 2 分）。

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。

14. 各サンプルウェルに 52 ul のヌクレアーゼフリー水を加えます。
15. ストリップキャップでふたをし、PCR プレートまたはストリップチューブを 5 秒間ボルテックスします。

2. インプット RNA の準備と cDNA 化

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、各ウェルの側面にビーズペレットが残っていないことを確認します。ビーズがペレット状にならない程度に軽くスピンドウンします。

16. 室温で 2 分間インキュベーションします。
17. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで待ちます（最大 5 分）。
18. 透明になった 50 μ l の溶液を新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップに進まない場合、ウェルにふたをして 4 °C で一晩または -20 °C で長期保存します。

3. ライブラリ調製



3. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製.....	26
Step 2. cDNA 3'末端の修復と dA 付加	27
Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション ...	29
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製	30
Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅.....	31
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製	33
Step 7. ライブラリの定量とサイズの確認.....	34

この章では、イルミナ社のペアエンドプラットフォームでシーケンスするための cDNA ライブラリ調製ステップを説明します。シーケンスする各サンプルについて、固有のデュアルインデックスと分子バーコードがついたライブラリを調製します。

この章のステップでは、表 13 に記載の試薬を使用します。使用前に(Where Used を参照)、表 13 に記載の方法で各試薬を融解し混合します。30 ページの準備のため、冷蔵保存の AMPure XP ビーズを室温に移し、30 分以上おきます。ビーズは凍結しないでください。

複数サンプルを処理するために、各ステップでは cDNA サンプル以外の試薬混合物を余剰を含めて準備します。例として、24 サンプル分の余剰を含めた混合量を各表に記載しています。

表 13 このステップで使用前に溶解する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
Ligation Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	26 ページ
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	26 ページ
End Repair-A Tailing Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	27 ページ
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	27 ページ
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (green cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	29 ページ

3. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製

29 ページのステップで使用する前に、ライゲーションマスターミックスを室温に平衡化します。末端修復・dA 付加の前にこのステップを始めます。この間サンプルは氷上におきます。

1. 溶液を均一にするために、融解した Ligation Buffer を高速のボルテックスで 15 秒間混合します。

CAUTION

このステップで使用する Ligation Buffer はとても粘性が高い試薬です。使用前に高速のボルテックスで 15 秒間、徹底的に混合します。他の試薬と混合するときは、混合液の少なくとも 80% の容量で吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、高速のボルテックスで 10 ~ 20 秒混合します。

プロトコルを通して、ストリップチューブまたは PCR プレートでボルテックスするときは、ボルテックスミキサの上部が平らなものを使用してください。ボルテックスで試薬を混合したときは、十分に混合されたことを目視で確認してください。

2. 表 14 にある試薬を混合し、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。
ピペットで Ligation Buffer をゆっくりと 1.5 ml チューブにとり、全量が吐き出されたことを確認します。ゆっくりと T4 DNA Ligase を添加し、添加後はチップ内の酵素をバッファーでリンスします。吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングするか、チューブにふたをして高速のボルテックスで 10 ~ 20 秒良く混合します。軽くスピンドウンし液を集めます。
29 ページで使用するまで、30 ~ 45 分室温におきます。

表 14 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 24 reactions [*] (includes excess)
Ligation Buffer (bottle)	23 µl	575 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	50 µl
Total	25 µl	625 µl

※ 96 反応分のキットのサポートされている最少サンプル数は、1 回当たり 24 サンプルです。各 24 サンプルを 4 回実行するため十分な量の試薬がキットに含まれています。

Step 2. cDNA 3'末端の修復と dA 付加

- 表 15 のようにサーマルサイクラのプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止します。

表 15 末端修復と dA 付加のためのサーマルサイクラプログラム※

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

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 70 µl に設定します。

- 溶液を均一にするために、融解した End Repair-A Tailing Buffer を高速のボルテックスで 15 秒間混合します。目視で溶液を確認し、固形物が見られたら溶けるまでボルテックスでの混合を続けます。

CAUTION

このステップで使用する End Repair-A Tailing Buffer は、使用前に高速のボルテックスで 15 秒間、徹底的に混合します。他の試薬と混合するときは、混合液の少なくとも 80% の容量で吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。

- 表 16 に従って適切な量の dA 付加マスターミックスを調製します。
ゆっくりとピペットで End Repair-A Tailing Buffer を 1.5 ml チューブに分注し、全量吐出されたことを確認します。End Repair-A Tailing Enzyme Mix をゆっくりと添加し、添加後はバッファでピペットチップをリンスします。吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピペティングで良く混合するか、チューブのふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。軽くスピンドウンして溶液を集め、氷上においておきます。

表 16 末端修復と dA 付加のマスターミックス

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

3. ライブラリ調製

4. 末端修復と dA 付加のマスターミックス 20 ul を、約 50 ul の精製した cDNA が入った各サンプルウェルに加えます。ピペットを 50 ul に設定し吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返し混合するか、ウェルにふたをして高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。
5. サンプルを軽くスピンドウンし、すぐに PCR 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セットし、表 15 のサーマルサイクラプログラムを再開します。

Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション

1. サーマルサイクラが 4 °C Hold のステップになったら、サンプルを氷上に移動し、以下のステップ中は氷上においておきます。
2. 表 17 にしたがってサーマルサイクラのプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止しておきます。

表 17 ライゲーションのためのサーマルサイクラプログラム※

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

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 100 ul と設定します。

3. 末端修復し dA 付加をした各 DNA サンプル(約 70 ul)に、26 ページで調製し室温においていたライゲーションマスターミックス 25 ul を添加します。70 ul に設定したピペットで吸引と吐出を少なくとも 10 回繰り返し良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。
4. XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (緑のキャップのチューブ)を 5 ul ずつ各サンプルに加えます。ピペットを 70 ul に設定し吸引と吐出を少なくとも 15 ~ 20 回繰り返しピペッティングで良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。

NOTE

プロトコル記載のように、必ずライゲーションマスターミックスと XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix はその都度サンプルに添加し、添加後は混合してください。

5. 軽くスピンドウンし溶液を集め、すぐに PCR 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セットし、表 17 のサーマルサイクラプログラムを再開します。

NOTE

このステップで、ユニークな分子バーコード配列が各ライブラリの DNA 断片の両側に取り込まれます。

3. ライブラリ調製

Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 ul (と余剰分)を調製します。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 各 cDNA サンプル(約 100 ul)に、均一にした 80 ul のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。ピペティングで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5 ~ 10 秒高速でボルテックスすることで混合します。
5. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 5 ~ 10 分)。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの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. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 ul 加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 をもう一度繰り返します。
11. ストリップキャップでふたをし、軽くスピンドアウンします。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
12. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします(約 1 ~ 2 分)。
13. 各サンプルウェルに 35 ul のヌクレアーゼフリー水を加えます。
14. ストリップキャップでふたをし、PCR プレートまたはストリップチューブをボルテックスでよく混合します。軽くスピンドアウンし溶液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで、約 5 分待ちます。
17. 透明になった約 34 ul の上澄みを新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

NOTE

このステップで、上澄み液が 34 ul に満たないこともあります。次のプロセスのためにできるだけ多くの上澄み液を回収してください。透明な上澄み液を最大限回収するために、P20 のピペットを 17 ul に設定し、2 回に分けて新しいウェルに移します。

Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅

このステップでは表 18 の試薬を使用します。開始前に表中の試薬を融解し氷上におきます。

表 18 pre-capture PCR 増幅の試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	32 ページ
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	32 ページ
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	32 ページ

*インデックスプライマーペアは 96 ウェルプレートの各ウェルに分注されています。

1. 各サンプルに対するインデックスペアを決めます。このステップで cDNA ライブラリを増幅するためのプライマーの 8 bp の塩基配列は 65 ページの表 47～72 ページの表 54 を参照してください。同一レーンでシーケンスするサンプルには、異なるインデックスプライマーペアを使用してください。

CAUTION

SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs は 1 回分の液量で提供されています。ライブラリのクロスコンタミネーションを避けるため、後の実験に残った試薬の再利用はしないでください。

2. 表 19 のようにサーマルサイクラのプログラムを設定します（蓋の加熱は ON にします）。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 6 でサンプルをセットするまで停止します。

表 19 Pre-capture PCR のサーマルサイクラプログラム※

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10–14 RNA インプット量に応じた推奨のサイクル数は表 20 を参照してください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 50 ul と設定します。

3. ライブラリ調製

表 20 Pre-capture PCR の推奨サイクル数

Quality of Input RNA	Quantity of Input RNA	Cycle Number
Intact RNA	100 to 200 ng	10 cycles
	50 ng	11 cycles
	10 ng	12 cycles
Good quality FFPE RNA (DV200 >50%)	100 to 200 ng	12 cycles
	50 ng	13 cycles
	10 ng	14 cycles
Poor quality FFPE RNA (DV200 20% to 50%)	100 to 200 ng	13 cycles
	50 ng	14 cycles

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、PCR 試薬(ライブラリ DNA 以外のすべての構成成分)は専用のクリーンエリアか UV 滅菌灯を備えた PCR フード内にて陽圧の環境下で実施してください。

3. 表 21 に従い適切な量の pre-capture PCR マスターミックスを調製し、氷上におきます。
ボルテックスミキサでよく混合します。

表 21 Pre-capture PCR マスターミックスの調製

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

4. 各精製 DNA ライブラリサンプル(34 µl)に、表 21 で調製した 11 µl の PCR マスターミックスを添加します。
5. 各反応液に 5 µl の適切な SureSelect XT HS2 Index Primer Pair を添加します。
ウェルにふたをして高速のボルテックスで 5 秒間混合します。PCR プレートまたはストリップチューブを軽くスピンドウンし、液を集め泡をなくします。
6. サーマルサイクラにセットする前に、表 19 のサーマルサイクラプログラムを開始し、サーマルサイクラのブロックが 98 °Cになるまで待ちます。98 °Cに達したらすぐに、PCR プレートまたはストリップチューブをサーマルブロックにセットし蓋を閉めます。

CAUTION

サーマルサイクラのリッドは熱くなっており、やけどの恐れがあります。蓋付近での動作にご注意ください。

Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 ul (と余剰分)を調製します。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 約 50 ul の PCR 増幅サンプルに、均一にした 50 ul のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。ピペティングで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5 ~ 10 秒高速でボルテックスすることで混合します。
5. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます(約 5 分)。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの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. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 ul 加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 をもう一度繰り返します。
11. ストリップキャップでふたをし、軽くスピンドアウンします。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
12. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °Cに設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします(約 1-2 分)。
13. 各サンプルウェルに 15 ul のヌクレアーゼフリー水を加えます。
14. ストリップキャップでふたをし、PCR プレートまたはストリップチューブをボルテックスでよく混合します。軽くスピンドアウンし溶液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで 2 ~ 3 分待ちます。
17. 透明になった約 15 ul の上澄みを新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

NOTE

このステップで、上澄み液が 15 ul に満たないこともあります。次のプロセスのためにできるだけ多くの上澄み液を回収してください。

Stopping Point 次のステップに進まないときは、サンプルウェルにふたをして 4 °Cで一晩、または -20 °Cで長期保存します。

3. ライブラリ調製

Step 7. ライブラリの定量とサイズの確認

各サンプルを表 22 のいずれかのプラットフォームで分析します。各プラットフォームのマニュアルは弊社サポートサイトをご覧ください。各分析メソッドで得られるエレクトロフェログラムは、サンプル中の断片サイズの分布を示し DNA サンプルの定量が可能です。断片サイズの分布のガイドラインは表 23 を参照にしてください。質の高い RNA サンプルまたは FFPE 由来 RNA サンプルから調製された典型的な結果として、TapeStation システムで得られる代表的なエレクトロフェログラムを示しています。

表 22 Pre-capture ライブラリの分析オプション

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

各アッセイの和文ユーザーマニュアルは、弊社サポートサイトをご覧ください。

表 23 Pre-capture ライブラリの評価ガイドライン

Input RNA type	Expected library DNA fragment size peak position	NGS read lengths supported
High-quality RNA or FFPE RNA	200 to 700 bp	2 ×100 reads or 2 ×150 reads

予想されるライブラリ断片のピークの他に低分子のピークが観察された場合、ライブラリ中のアダプターダイマーの存在を示しています。アダプターダイマーがこの章で例示しているエレクトロフェログラムのように少ない量なら、ライブラリのターゲットエンリッチメントに進んでかまいません。追加の検討事項は、75 ページのトラブルシューティングを参照してください。

1. ユーザーマニュアルに従い機器のセットアップをします
2. 分析用にサンプルを準備し、ユーザーマニュアルに従いアッセイをセットアップし、ランを行います。
3. エレクトロフェログラムで、DNA 断片長が想定されるサイズか確認します (ガイドラインは表 23 を参照してください)。質の高い RNA サンプル (図 2)、FFPE 由来サンプル (図 3) から調製したライブラリを TapeStation で泳動した例を示します。
表 22 にある別の泳動装置から得られるエレクトロフェログラムでも同様な断片サイズになります。
4. ピーク領域の DNA ライブラリの濃度を測定します。正確な定量のために、測定された濃度が泳動アッセイの検出範囲に入っていることを確認してください。

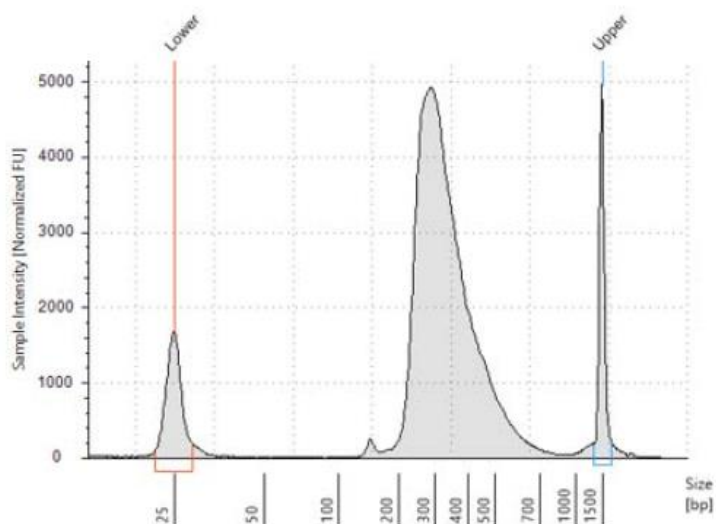


図 2 質の高い RNA サンプル(Human Reference total RNA)から調製された pre-capture ライブラリの D1000 ScreenTape での泳動図

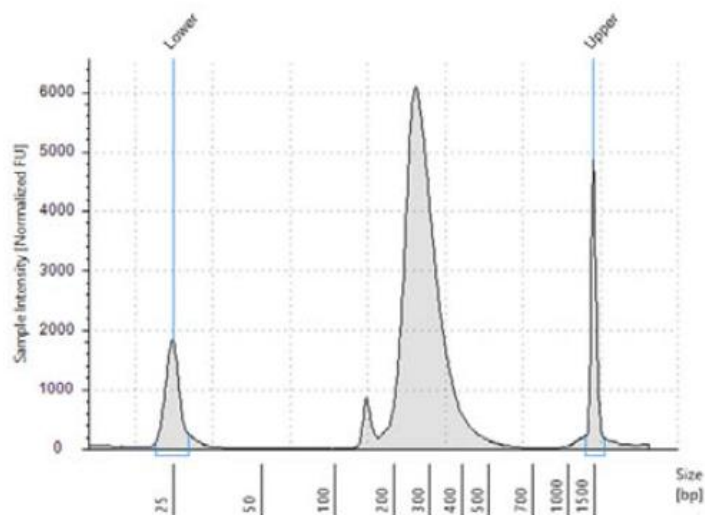


図 3 典型的な FFPE 由来 RNA サンプルから調製された pre-capture ライブラリの D1000 ScreenTape での泳動図



4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Step 1. Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付加 cDNA のプール.....	37
Step 2. cDNA ライブラリとプローブのハイブリダイズ.....	38
Step 3. ストレプトアビジンビーズの準備.....	42
Step 4. ストレプトアビジンビーズによるハイブリダイズ DNA のキャプチャ.....	43

この章では、インデックス付加した cDNA ライブラリをプールし、ターゲット特異的なプローブキャプチャライブラリとハイブリダイズするステップを説明します。インデックス付加した 8 または 16 サンプルのプールは適切なプローブとハイブリダイズし、ターゲット分子はストレプトアビジンビーズにキャプチャされます。

プールするサンプルの推奨の数はキャプチャプローブによって異なります。プールの推奨は表 24 をご覧ください。

標準的な 1 日で操作を行うプロトコルでは、ハイブリダイゼーションステップ(約 90 分)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、39 ページに記載の簡単な変更で、ハイブリダイゼーションを一晩行い、キャプチャおよび増幅ステップを翌日に行うことができます。

CAUTION

プローブと cDNA ライブラリの比率はキャプチャの成功にとっても重要です。

Step 1. ハイブリダイゼーションのためのインデックス付加 cDNA のプール

このステップでは、インデックス付加した cDNA サンプルをプールし、液量を 12 ul に調節し、SureSelect または ClearSeq プローブキャプチャライブラリとハイブリダイゼーションします。

ハイブリダイゼーションの反応には、8 または 16 ライブラリを等量混合した、計 600 ng のインデックス付加 cDNA ライブラリが必要です。ハイブリダイゼーションに使用するプローブに基づいた、cDNA ライブラリの推奨プール構成は、表 24 を参照してください。

表 24 プレキャプチャプールの推奨

Probe Capture Library description	Number of indexed cDNA libraries per pool	Amount of each cDNA library in pool
SureSelect Custom Probe	16	37.5 ng
ClearSeq Comprehensive Cancer Probe	16	37.5 ng
SureSelect Human or Mouse All-Exon Probe	8	75 ng
SureSelect Clinical Research Exome Probe	8	75 ng
SureSelect Focused Exome Probe	8	75 ng
ClearSeq Inherited Disease Probe	8	75 ng

1. ストリップチューブまたはプレートの各ウェルに、キャプチャ反応プールごとに各インデックス付加 cDNA ライブラリサンプルを適切な量で混合します。
最終的な各キャプチャ反応プールは、600 ng のインデックス付加 cDNA が含まれている必要があります。
2. 濃縮遠心機を 45 °C 以下に設定し、各ウェルを 12 ul 未満にします。
完全にサンプルを乾燥させないようにします。インデックス付加 cDNA を乾燥しすぎるとターゲットエンリッチメントに悪影響が出ることがあります。
3. 最終量が 12 ul になるように濃縮した各 cDNA プールに必要な量のヌクレアーゼフリー水を加えます。
4. ウェルにふたをし、ストリップチューブまたはプレートを 30 秒ボルテックスミキサーでよく混合します。スピンドウンしてウェルの底に液を集め、39 ページで使用するまで氷上におきます。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Step 2. cDNA ライブラリとプローブのハイブリダイズ

このステップでは、インデックス付加 cDNA ライブラリのプールとターゲット特異的なプローブキャプチャライブラリをハイブリダイズします。表 25 の試薬を使用します。各試薬を表に記載のように溶解し、ボルテックスして混合し、軽くスピンドウンし溶液を集めます。

表 25 ハイブリダイゼーションに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Where Used
SureSelect XT HS2 Blocker Mix (blue cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	39 ページ
SureSelect RNase Block (purple cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw on ice	40 ページ
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Thaw and keep at Room Temperature	41 ページ
Probe Capture Library	-80°C	Thaw on ice	41 ページ

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

1. サーマルサイクラのプログラムを表 26 のように設定します (蓋の加熱は ON にします)。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 3 でサンプルをセットするまで停止します。

表 26 ハイブリダイゼーションのためのサーマルサイクラプログラム※

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	1 minute
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C	Hold

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 30 ul (セグメント 4 のハイブリダイゼーション反応時の最終液量) に設定します。

NOTE

次の変更を加えることで、ハイブリダイゼーション反応を一晩で行うことも可能です。

- ・サーマルサイクラプログラム (表 26) のセグメント 5 で、65 °C Hold ステップを 21 °C Hold に変更します。
- ・ステップ 1 に記載のようにサーマルプログラムを一時停止し、プログラムを再開する前に、39~41 ページのハイブリダイゼーションのセットアップを完了します。
- ・ハイブリダイゼーションサンプルは 21 °C で最大 16 時間まで保管できます。42 ページのストレプトアビジンビーズの準備ステップを、43 ページのキャプチャステップを始める直前に完了させます。各サンプルに洗浄済みのストレプトアビジンビーズを添加する直前に、ハイブリダイゼーションサンプルを室温に移動します。

2. プールした 12 ul の DNA ライブラリ (600 ng のプールライブラリ) の各ウェルに、5 ul の SureSelect XT HS2 Blocker Mix を添加します。ウェルにふたをして高速で 5 秒間ボルテックスします。PCR プレートまたはストリップチューブを軽くスピンドアウンし、溶液を集め泡をなくします。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋は熱くなっておりやけどの恐れがあります。蓋付近での動作にご注意ください。

3. ふたをした PCR 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移し、表 26 および 40 ページ表 27 のサーマルサイクラプログラムを再開します。

重要: セグメント 3 で一時停止し、41 ページのステップ 7 でハイブリダイゼーションウェルに追加の試薬を加えることにご注意ください。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

サーマルプログラムのセグメント 1 と 2 の進行中に、次のステップ 4 およびステップ 5 に記載の追加の試薬を準備します。場合によっては、セグメント 3 で一時停止したのちに試薬の準備が終わってもかまいません。

表 27 一時停止を含むハイブリダイゼーションのためのサーマルサイクラプログラム

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	5 minutes
2	1	65°C	10 minutes
3	1	65°C	1 minute ここで一時停止
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C	Hold*

*サーマルサイクラが 65 °CHold のステップになったら、43 ページのキャプチャステップを開始します。

- 表 28 に従い 25%の SureSelect RNase Block (RNase Block:ヌクレアーゼフリー水=1:3)を準備します。ハイブリダイゼーション反応数に必要な量を余剰分を含め調製し、よく混合して氷上におきます。

表 28 RNase Block 溶液の準備

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

NOTE

40 ページに記載のセグメント 3 を一時停止する直前に、ステップ 5 に記載のように混合液を準備します。41 ページのステップ 7 で DNA サンプルに添加するまでの短い間、混合液は室温におきます。プローブを含む溶液を、必要以上に室温におかないでください。

- ライブラリのデザインサイズに応じてキャプチャライブラリハイブリダイゼーションミックスを準備します。プローブキャプチャサイズが ≥ 3Mb の時は表 29 を、< 3Mb の時は表 30 を参照してください。

これらの試薬を室温で調製します。高速のボルテックスで 5 秒間混合し、軽くスピンドウンします。すぐにステップ 6 へ進んでください。

表 29 プローブデザインサイズが ≥ 3 Mb のキャプチャライブラリハイブリダイゼーションミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Hyb reaction	Volume for 6 Hyb reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 4)	2 μ l	14 μ l
Probe (with design ≥ 3 Mb)	5 μ l	35 μ l
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 μ l	42 μ l
Total	13 μl	91 μl

表 30 プローブデザインサイズが < 3 Mb のキャプチャライブラリハイブリダイゼーションミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Hyb reaction	Volume for 6 Hyb reactions (includes excess)
25% RNase Block solution (from step 4)	2 μ l	14 μ l
Probe (with design < 3 Mb)	2 μ l	14 μ l
SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 μ l	42 μ l
Nuclease-free water	3 μ l	21 μ l
Total	13 μl	91 μl

6. サーマルプログラムが表 27 のセグメント 3(1 分 65 $^{\circ}$ C)になったら、プログラムを一時停止します。一時停止し DNA と Blocker の混合サンプルをサーマルサイクラにセットしたまま、ステップ 5 で調製した室温のキャプチャライブラリハイブリダイゼーションミックスを 13 μ l ずつ、各ウェルに添加します。吸引と吐出を 8 ~ 10 回繰り返しピペettingで良く混合します。
ハイブリダイゼーション反応液は約 30 μ l になります。
7. 新しいドーム型のストリップキャップでふたをします。すべてのウェルでふたがしっかりしまっていることを確認してください。軽くボルテックスし、PCR プレートまたはストリップチューブを軽くスピンドアウンすることで、各ウェルの底にある泡を除きます。すぐに PCR 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戻します。
8. サーマルサイクラプログラムを再開し、準備した DNA サンプルとプローブキャプチャライブラリをハイブリダイズします。

CAUTION

蒸発を最小限に抑えるため、ウェルをしっかり密閉する必要があります。蒸発すると結果に悪影響が出る恐れがあります。

初めて実験を行う前に、使用予定のプラスチック製品と密閉方法がサーマルサイクラに適していることを確認してください。ハイブリダイゼーションの条件下で 4 μ l 以上の蒸発がないことを確認してください。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Step 3. ストレプトアビジンビーズの準備

残りのキャプチャステップは、表 31 の試薬を使用します。

41 ページのステップ 8 のハイブリダイゼーションを開始した約 1 時間後に以下のビーズ準備を開始します。

表 31 キャプチャの試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	42 ページ
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	43 ページ
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), RT	43 ページ
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Beads	4°C	42 ページ

1. ストレプトアビジンビーズのバイアルをボルテックスミキサでしっかり混合します。保存中に磁気ビーズは沈降しています。
2. 各ハイブリダイゼーションサンプル用に、50 ul の再懸濁したビーズを新しい PCR プレートまたはストリップチューブの各ウェルに入れます。
3. 以下のようにビーズを洗浄します。
 - a. 200 ul の SureSelect Binding Buffer を添加します。
 - b. 吸引と吐出を 20 回繰り返しピペティングで混合するか、ふたを閉めて高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合し、軽くスピンドウンします。
 - c. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。
 - d. 5 分間または溶液が透明になるまで待ち、上澄み液を取り除き廃棄します。
 - e. ステップ a からステップ d をさらに 2 回繰り返し、計 3 回洗浄します。
4. 200 ul の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。

NOTE

より大量の磁気ビーズキャプチャが必要な場合は、代わりにマイクロ遠心チューブまたはコニカルバイアルでストレプトアビジンビーズをまとめて洗浄することができます。

Step 4. ストレプトアビジンビーズによるハイブリダイズ DNA のキャプチャ

1. ストレプトアビジンビーズのすべての準備が終わり、ハイブリダイゼーションのサーマルプログラムが 65 °C Hold のステップ (40 ページ表 27 のセグメント 5) になったら、サンプルを室温に移します。
2. マルチチャンネルピペットを使用して、すぐに全量約 30 ul の各ハイブリダイゼーション混合液を 200 ul のストレプトアビジンビーズが入ったウェルに加えます。
吸引と吐出を 5 ~ 8 回繰り返しピPETTING で良く混合し新しいキャップでふたをします。
3. PCR プレートまたはストリップチューブを 96 ウェルプレートミキサーでよく混合しながら (1400 ~ 1900 rpm)、室温で 30 分インキュベートします。
ウェル中のサンプルがきちんと混合されていることを確認します。
4. 30 分のインキュベーションでキャプチャしている間に、以下の手順で SureSelect Wash Buffer 2 を 70 °C に温めます。
 - a. 新しい PCR プレートまたはストリップチューブに SureSelect Wash Buffer 2 を 200 ul 分注します。各ハイブリダイゼーション反応あたり 6 ウェルの SureSelect Wash Buffer 2 が必要です。
 - b. ウェルにふたをし、ステップ 9 で使用するまでサーマルサイクラで 70 °C でインキュベートします。
5. ステップ 3 で開始した 30 分のインキュベーションが終了したら、軽くスピンドウンし溶液を集めます。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを、ビーズを集めるために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、上澄み液全てを取り除き廃棄します。
7. 200 ul の SureSelect Wash Buffer 1 にビーズを再懸濁します。ビーズが完全に再懸濁されるまで、吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピPETTING で良く混合します。
8. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで待ち (約 1 分)、上澄み液全てを取り除き廃棄します。

CAUTION

以下の洗浄操作の間、ビーズ溶液が 70 °C に保たれていることがキャプチャの特異性を確保するために重要です。

使用前に SureSelect Wash Buffer 2 が 70 °C に加温されていることを確認してください。

インキュベーションのステップには、組織培養用インキュベータなど温度の振れ幅が著しい装置は使用しないでください。

9. **PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドから外し、室温にあるラックに移します。**
以下の手順でビーズを Wash Buffer 2 で洗浄します。
 - a. ビーズを 200 ul の 70 °C に加温された Wash Buffer 2 に再懸濁します。ビーズが完全に再懸濁されるまで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返しピPETTING します。
 - b. 新しいふたでウェルを注意深く密閉し、高速のボルテックスで 8 秒間混合します。ビーズがペレット状にならない程度に PCR プレートまたはストリップチューブをスピンドウンします。
次に進む前にビーズが懸濁されたことを確認します。

4. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

- c. サンプルをサーマルサイクラで 5 分間 70 °C インキュベートします。サーマルサイクラの蓋の加熱は ON にします。
 - d. PCR プレートまたはストリップチューブを室温で磁石スタンドにセットします。
 - e. 溶液が透明になるまで待ち (約 1 分)、上澄み液全てを取り除き廃棄します。
 - f. ステップ a から e を 5 回繰り返し、計 6 回洗浄します。
10. 全ての洗浄バッファが除かれたことを確認し、25 ul の Nuclease Free Water を各サンプルウェルに加えます。吸引と吐出を 8 回繰り返し、ビーズを再懸濁します。
- 47 ページで使用するまで氷上におきます。

NOTE

キャプチャした DNA はキャプチャ後の増幅ステップまで、ストレプトアビジンビーズに吸着しています。



5. マルチプレックスシーケンスのための キャプチャ後サンプル調製

Step 1. キャプチャしたライブラリの増幅	46
Step 2. 増幅したキャプチャライブラリの AMPure XP ビーズによる精製	49
Step 3. シークエンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	50
Step 4. オプション: マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール	52
Step 5. シークエンスサンプルの準備	54
Step 6. シーケンスの開始とデータ解析	56

この章では、キャプチャしたライブラリを増幅、精製、定量とサイズ確認をするステップを説明します。マルチプレックスシーケンスのために、インデックスと分子バーコードが含まれるサンプルを準備し、オプションでポストキャプチャプールをする内容が含まれています。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Step 1. キャプチャしたライブラリの増幅

このステップでは、SureSelect でエンリッチされた DNA ライブラリを PCR 増幅します。

表 32 に記載の試薬を使用します。開始前に試薬を解凍し氷上におきます。49 ページで使用する AMPure XP ビーズを使用する少なくとも 30 分前までに、4 °C から室温に移動します。ビーズは絶対に凍らせないでください。

表 32 Post-capture PCR 増幅のための試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	47 ページ
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	47 ページ
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	47 ページ

ターゲットエンリッチされた、各 DNA ライブラリプールに対して 1 増幅反応を実施してください。

CAUTION

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

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

1. サーマルサイクラのプログラムを表 33 のように設定します（蓋の加熱は ON にします）。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止します。

表 33 Post-capture PCR のサーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	12–16 デザインサイズに基づいた推奨サイ クル数は表 34 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 34 Post-capture PCR の推奨サイクル数

Probe Design Size	Cycles
Probes <0.2 Mb	16 cycles
Probes 0.2–3 Mb	14 cycles
Probes 3–5 Mb	13 cycles
Probes >5 Mb	12 cycles

2. 表 35 に従い、適切な量の PCR 混合液を氷上で調製します。ボルテックスでよく混合します。

表 35 Post-capture PCR の混合液

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

3. ターゲットエンリッチされた DNA が結合した 25 µl の各ビーズ溶液(44 ページで調製し氷上においてのもの)に、表 35 で準備した PCR 混合液を 25 µl 添加します。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

4. ビーズ溶液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に飛び散らないように、このステップではスピンドアウンは避けます。
5. PCR 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セットし、47 ページの表 33 のサーマルサイクラプログラムを開始します。
6. PCR 増幅プログラムが終了したら、PCR プレートまたはストリップチューブを軽くスピンドアウンします。室温で PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、ストレプトアビジンビーズを除去します。溶液が透明になるまで約 2 分待ち、約 50 μ l の各上澄み液を新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し替えます。
ビーズはこのステップで廃棄します。

Step 2. 増幅したキャプチャライブラリの AMPure XP ビーズによる精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 ul（と余剰分）を調製します。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 約 50 ul の PCR 増幅サンプルに、均一にした 50 ul のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。
ピペティングで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5 ~ 10 秒高速でボルテックスすることで混合します。
各サンプルウェルでビーズが均一に懸濁されていることを確認します。各ウェルはビーズの層や透明な溶液がなく、均一な色をしている必要があります。
5. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます（約 3 ~ 5 分）。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの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. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 ul 加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 をもう一度繰り返し、計 2 回洗浄します。各洗浄ステップでエタノールを完全に除去します。
11. ストリップキャップでふたをし、軽くスピンドアウンし残ったエタノールを集めます。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
12. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします（約 1 ~ 2 分）。
13. 各サンプルウェルに 25 ul の Low TE buffer (10 mM Tris pH 7.5 – 8.0, 0.1mM EDTA) を加えます。
14. ストリップキャップでふたをし、PCR プレートまたはストリップチューブをボルテックスでよく混合します。
ビーズがペレット状にならない程度に軽くスピンドアウンし溶液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、2 分間または溶液が透明になるまで待ちます。
17. 透明になった約 25 ul の上澄みを新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Step 3. シークエンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認

各ライブラリを表 36 にあるプラットフォームのいずれかで解析します。各プラットフォームのユーザーマニュアルは弊社サポートサイトをご覧ください。想定される断片サイズのガイドラインは表 37 を参照してください。質の高い RNA サンプルまたは FFPE 由来 RNA サンプルから調製された典型的な結果として、TapeStation システムで得られる代表的なエレクトロフェログラムを示しています。

表 36 Post-capture ライブラリを評価するプラットフォーム

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

表 37 Post-capture ライブラリの評価ガイドライン

Input RNA type	Expected library DNA fragment size peak position	NGS read lengths supported
High-quality RNA or FFPE RNA	200 to 700 bp	2 ×100 reads or 2 ×150 reads

1. 適切なユーザーマニュアルに従い機器のセットアップをします
2. 分析用にサンプルを準備し、ユーザーマニュアルに従いアッセイをセットアップし、ランを行います。
3. エレクトロフェログラムで、DNA 断片長が想定されるサイズか確認します (ガイドラインは表 37 を参照してください)。質の高い RNA サンプル (図 4)、FFPE 由来サンプル (図 5) から調製したライブラリを TapeStation で泳動した例を示します。

表 36 にある別の泳動装置から得られるエレクトロフェログラムでも同様な断片サイズになります。

4. ピーク領域の DNA ライブラリの濃度を測定します。正確な定量のために、測定された濃度が泳動アッセイの検出範囲に入っていることを確認してください。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

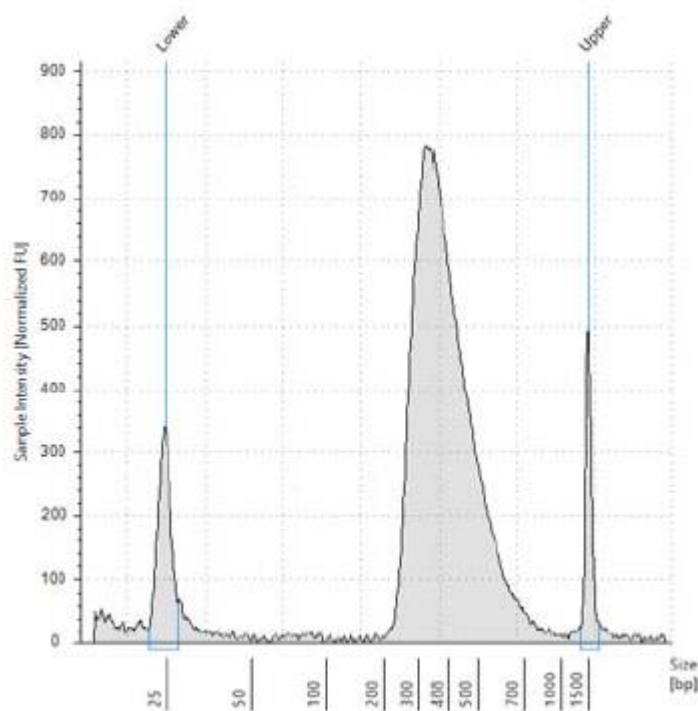


図 4 質の高い RNA サンプル(Human Reference total RNA)から調製された Post-capture ライブラリの High Sensitivity D1000 ScreenTape での泳動図

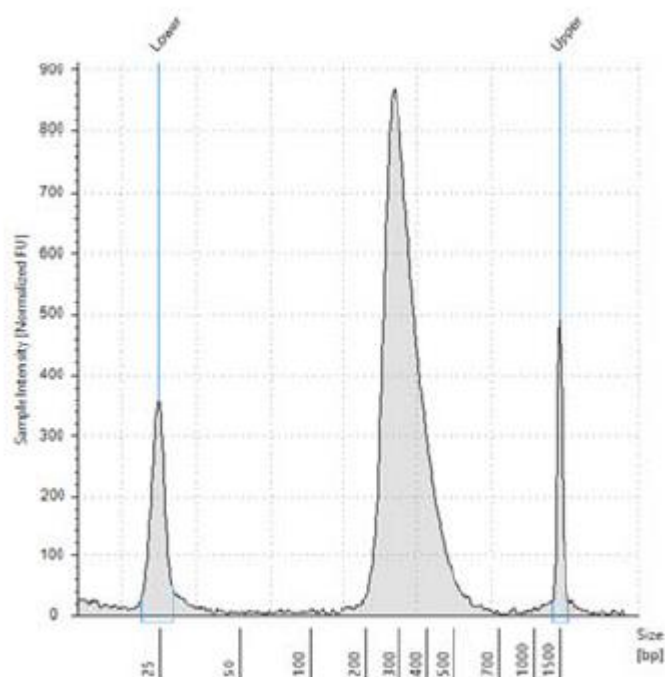


図 5 典型的な FFPE 由来 RNA サンプルから調製された Post-capture ライブラリの High Sensitivity D1000 ScreenTape での泳動図

Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルウェルにふたをして 4 °Cで一晩、-20 °Cで長期保存します。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Step 4. オプション: マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

プローブキャプチャライブラリやキャプチャ前のプール方法に基づいて、最終的なキャプチャ DNA サンプルは 8 または 16 のインデックス付きライブラリで構成されています。お使いのシーケンスプラットフォームに合わせて、8 プレックスまたは 16 プレックスサンプルをさらにポストキャプチャプールで混合することができます。

ポストキャプチャプールを行うかは、1 レーンあたりに混合できるインデックス数や使用するプラットフォームの出力仕様、研究デザインに必要なシーケンス量を計算して決定します。ポストキャプチャプールを行う場合は、以下の手順で混合します。

ポストキャプチャプールを行わない場合は、54 ページに進みます。

以下のガイドラインに沿って、各インデックスサンプルがプール中で等モル量になるように、ライブラリを混合します。

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

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

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

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

#: プールするインデックスの数

C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 38 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 ul の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 38 10 nM の濃度でトータル 20 μ l に調製する計算例

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

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

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Step 5. シーケンスサンプルの準備

最終的な SureSelect XT HS2 RNA 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ーでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 6 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

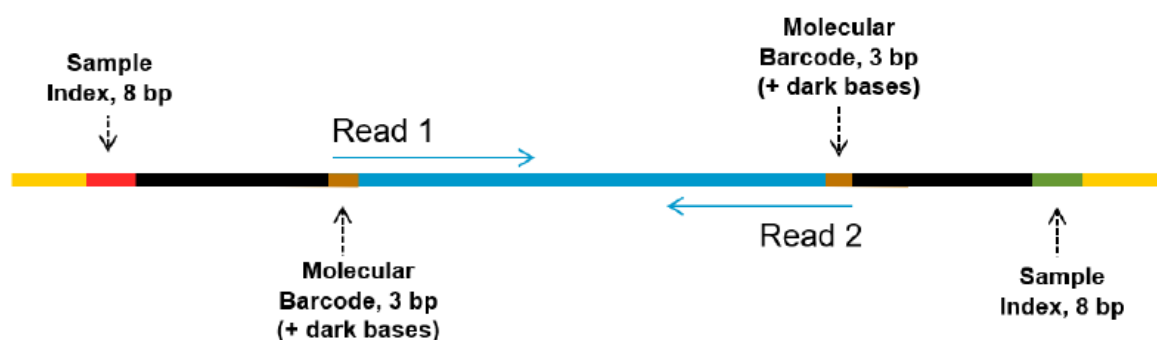


図 6 SureSelect XT HS2 シーケンスライブラリの構造

各断片は 1 つのターゲットインサート(青)はイルミナ paired-end シーケンスエレメンツ(黒)とユニークデュアルインデックス(赤および緑)、Duplex 分子バーコード(茶)、ライブラリ PCR プライマ(黄)が付加されています。

ライブラリはイルミナ社 HiSeq、MiSeq、NextSeq、NovaSeq プラットフォームでシーケンスすることができます。

使用するランタイプとケミストリーの組み合わせは表 39 をご覧ください。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスター増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は表 39 に示されています。

SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチライブラリに最適なシーディング濃度は、使用するシーケンスプラットフォーム、ランタイプ、イルミナ社キットのバージョンにより異なります。ガイドラインについては表 39 を参照してください。シーディング濃度とクラスター密度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、求められるアウトプットやデータの質に基づき、最適化が必要な場合もあります。表 39 の内容に記載されている範囲の中間のシーディング濃度から最適化を行ってください。

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

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 39 イルミナ社キット選択ガイドライン

Platform	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry	Seeding Concentration
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	4×50 Cycle Kits *	v3	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	12–14 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2	9–10 pM
MiSeq	All Runs	2 × 75 bp	150 Cycle Kit	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	230–240 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	300–500 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	200–400 pM

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

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Step 6. シーケンスの開始とデータ解析

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

- ・ サンプルレベルインデックスには 8 bp のインデックスリードが必要です。インデックス塩基配列情報については 65~72 ページをご参照ください。
- ・ HiSeq・NextSeq・NovaSeq プラットフォームでは、装置のユーザインターフェースからランのセットアップを行いません。57 ページのガイドラインに従ってください。
- ・ MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM)を用いてランのセットアップを行います。57~59 ページに記載されている手順に従い、カスタムサンプルシートを作成します。
- ・ Illumina 社の bcl2fastq ソフトウェアでデマルチプレックスを行い、デュアルインデックスに基づいたペアエンドリードを作成し、P5 および P7 の間違っただペアを除きます。
- ・ ライブラリフラグメントは各ストランドに分子バーコード(MBC)を含みます(54 ページの図 6 参照)。両方のストランドが存在し、ストランド内の MBC を一致させて二重のコンセンサスリードを形成する DNA とは異なり、一本鎖 RNA は1つのコンセンサスリードが形成されることに注意してください。
- ・ MBC 配列と dark base は、リード 1 およびリード 2 両方の 5'端に含まれます。MBC の抽出やトリミングは Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT)を使用してください(詳細は 59 ページをご覧ください)。ご使用のシーケンス解析パイプラインに MBC 解析を含まない場合、60 ページの Note にあるように、アライメント前に各リードの最初の 5 塩基をトリミングするかマスクしてください。
- ・ リファレンス配列にリードをアライメントする前に、アダプター配列中の MBC を適切に処理できるアジレント AGeNT のトリマーモジュールで Illumina アダプター配列をリードから除く必要があります。詳細は 60 ページを参照してください。Illumina Experiment Manager (IEM)のアダプタートリミングのオプションは使用しないでください。シーケンスのラン設定をする際に、IEM のアダプタートリミングオプションのチェックボックスは外れていることを確認してください。

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

装置のコントロールソフトウェアの画面から、表 40 に従ってシーケンスのランセットアップを行います。HiSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面の Run configuration スクリーンで Dual Index を選び表 40 のサイクル数を入力します。

NextSeq または NovaSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面で Run Setup スクリーンを立ち上げ表 40 のリード長を入力します。カスタムプライマーセクションでは、すべてのプライマー (Read1, Read2, Index1 および Index2) のチェックボックスを外します。

表 40 ラン設定

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

【MiSeq プラットフォームによるシーケンスのセットアップガイドライン】

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM)ソフトウェアを用いてカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT HS2 インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS2 インデックスペアの塩基配列は、65 ページの表 47~72 ページの表 54 を参照してください。

カスタム Sample Sheet のセットアップ

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

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

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

Library Prep Workflow の項目は、TruSeq Nano DNA を選択します。Index Adapters の項目は TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)を選択します。アダプタートリミングはアジレント AGeNT で行う必要があるため、FASTQ Only Workflow-Specific Setting 内の adaptor-trimming チェックボックス(下図赤で囲んだ部分)は両方とも外します(デフォルトでチェックが入っています)。

もし TruSeq Nano DNA が Sample Prep Kit の項目にない場合は、代わりに TruSeq HT を選択します。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

- Sample Sheet Wizard を使用して、シーケンスする各サンプルの必要な情報を入力して、New Plate をセットアップします。I7 Sequence カラムには、各サンプルをいずれかの Illumina の i7 インデックスに割り当てます。インデックスは後のステップで SureSelect XT HS2 インデックスに変更します。

同様に、I5 Sequence カラムにも、いずれかの Illumina の i5 インデックスに割り当てます。i5 インデックスも後のステップで SureSelect XT HS2 インデックスに入力内容を変更します。

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

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

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

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

- Sample Sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、カラム 5 ~ 8 の i7、i5 のインデックス情報を変更します（下図、黄色くハイライトされた部分）。SureSelect XT HS2 インデックスの塩基配列は 65 ページの表 47 ~ 72 ページの表 54 をご覧ください。
- 5 番目の I7_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。6 番目の index カラムには、適切な P7 インデックス配列を入力します。
- 7 番目の I5_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。8 番目の index2 カラムには、適切な P5 インデックス配列を入力します。

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

図 7 SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンスのための Sample Sheet

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

【データ解析リソース】

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 RNA ライブラリのデータ解析に適した典型的な NGS 解析パイプラインステップです。お使いの NGS 解析パイプラインによって異なります。

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

デマルチプレックスを行った FASTQ データは、Agilent Genomics NestGen Toolkit (AGeNT)を用いて前処理し、シーケンシングアダプターの除去および分子バーコード(MBC)配列の抽出を行う必要があります。

5. マルチプレックスのためのキャプチャ後サンプル調製

まず、AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、MBC 処理したアダプタートリミングとデュプリケートリードを認識します。この toolkit は、バイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、インターナショナルな解析パイプラインの構築、統合、メンテナンスおよびトラブルシュートができるようにデザインされています。詳細な情報や toolkit のダウンロードは www.genomics.agilent.com の AGeNT ページをご覧ください。

NOTE

お使いの解析パイプラインで MBC を除く場合、次の解析ステップに進む前にリード 1 およびリード 2 の最初の 5 塩基をマスキングまたはトリミングすることで除けます。マスキングでデマルチプレックスをすることで除くには、ベースマスク **N5Y*,I8,I8,N5Y***(*は実際のリード長に置き換えてください。RunInfo.xml ファイルのリード長です)を含めてください。もしくは最初の 5 塩基は、seqtk のような適切な処理ツールでデマルチプレックスした fastq ファイルからトリミングされます。あるいは、AGeNT のトリミングモジュールで MBC に加えアダプター配列も除去できます。標準的なアダプタートリマーは、MBC の反対側のアダプター(図 6 参照)を除くことができない場合があります。

トリミングしたリードはアラインされ、BWA-MEM のような適切なツールで MBC タグがアラインした BAM ファイルに付加されます。アライメントとタグ付けが完了すると、AGeNT LocalItt モジュールがコンセンサスリードの生成やデュプリケートのマーク付けまたは除去に使用できます。BAM ファイルはバリエーションディスカバリを含む下流の解析に使用できます。

RNA 鎖特異性のガイドライン

SureSelect XT HS2 RNA シーケンシングライブラリ調製方法は、2nd ストランド合成時に dUTP を使用することで RNA 鎖特異性を保持しています。P5 端から始まるリード 1 の配列は、poly(A) RNA トランスクリプト鎖の相補鎖です。P7 端から始まるリード 2 の配列は、poly(A)RNA トランスクリプト鎖と一致します。解析時にストランド特異性を決めるには、この情報を含める必要があります。例えば RNA シーケンシングメトリクスを計算するために Picard ツール(<https://broadinstitute.github.io/picard>)を使用する場合、ストランド特異性のメトリクスを正確に計算するために STRAND_SPECIFICITY=SECOND_READ_TRANSCRIPTION_STRAND というパラメータを含むことが重要です。



6. リファレンス

キット内容 62

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報64

トラブルシューティングガイド75

Quick Reference Protocol.....77

この章では、構成キットの内容、インデックス配列やトラブルシューティングなどの情報を説明します。

6. リファレンス

キット内容

プレキャプチャプールのプロトコルで使用する SureSelect XT HS2 RNA ターゲットエンリッチメント試薬キットは、表 41 に示す構成キットを含みます。表 41 にリスト化された複数の構成キットの詳細な内容は表 42 から表 46 に示します。

表 41 構成キット

Kit Name (p/n)	Component Kit Name	Component Kit p/n	Storage Condition
SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit, 96 Reactions (G9993A through G9993D)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR)	5500-0149	–20°C
	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	5500-0151	–20°C
	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	5191-5688 (Index Pairs 1–96), 5191-5689 (Index Pairs 97–192), 5191-5690 (Index Pairs 193–288), OR 5191-5691 (Index Pairs 289–384)	–20°C
SureSelect XT HS2 RNA Target Enrichment Kit, 12 Hybs (G9994A)	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	5191-6689	Room Temperature
	SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	5191-6690	–20°C

表 42 SureSelect cDNA Module (Pre PCR)の内容

Kit Component	96 Reaction Kit Format
2X Priming Buffer	tube with purple cap
First Strand Master Mix*	amber tube with amber cap
Second Strand Enzyme Mix	bottle
Second Strand Oligo Mix	tube with yellow cap

*First Strand Master Mix はアクチノマイシン D を含みます。光の暴露から守るため、提供されている琥珀色のチューブから移し替えないでください。

表 43 SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)の内容

Kit Component	96 Reaction Kit Format
End Repair-A Tailing Enzyme Mix	tube with orange cap
End Repair-A Tailing Buffer	bottle
T4 DNA Ligase	tube with blue cap
Ligation Buffer	bottle
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap

表 44 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)の内容

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

表 45 SureSelect Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box1 (Post PCR)の内容

Kit Component	12 Hyb (96 Sample) Kit Format
SureSelect Binding Buffer	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle

表 46 SureSelect XT HS2 Target Enrichment Kit, ILM Hub Module Box2 (Post PCR)の内容

Kit Component	12 Hyb (96 Sample) Kit Format
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle
SureSelect XT HS2 Blocker Mix	tube with blue cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap
SureSelect Post-Capture Primer Mix	tube with clear cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap
5× Herculase II Buffer with dNTPs	tube with clear cap

6. リファレンス

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは、あらかじめ混合されています。各プライマーペアはユニークな 8 bp の P5 または P7 インデックスを持ち、デュアルインデックスが付加された NGS ライブラリが合成されます。各プライマーのインデックス部分の塩基配列は表 47 から表 54 に示しています。8 bp のインデックスを使用したライブラリをシーケンスするランのセットアップは 56 ページをご覧ください。

NOTE

P7 インデックスは、サポートされているイルミナプラットフォームのいずれでも対応している一方向で示しています。P5 インデックスは、異なるプラットフォームごとに二方向の配列を表示しています。P5 配列を参照する際は、表のヘッダーカラムを確認してください。

最初の P5 インデックスの方向は、NovaSeq 6000 v1.0 ケミストリー、MiSeq および HiSeq 2500 に対応しています。本ユーザーマニュアルではサポートしていませんが、この方向は HiSeq 2000 にも対応しています。

二つ目の P5 インデックスの方向は、NovaSeq 6000 v1.5 ケミストリー、NextSeq 500/550、HiSeq 4000 および HiSeq 3000 に対応しています。本ユーザーマニュアルではサポートしていませんが、この方向は iSeq 100、MiniSeq および HiSeq X にも対応しています。

1 つのプライマーペアは、96 ウェルプレート(プレートマップは 73~74 ページ参照)で提供されます。各ウェルにフォワードとリバースプライマーのペアが、1 回分の容量で分注されています。

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。

表 47 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1-48、オレンジ色の 96 ウェルプレート

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

6. リファレンス

表 48 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 49-96、オレンジ色の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
49	A07	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	A10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACAT
50	B07	ATGACGAA	TGAGGAGT	ACTCCTCA	74	B10	CAGTTGCG	AACGCATT	AATGCGTT
51	C07	TACGGCGA	ATGACGAA	TTCGTCAT	75	C10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D07	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	E07	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTCGCT	77	E10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	F07	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	F10	AAGAACCT	GCAATGAA	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 49 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 #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
97	A01	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	A04	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	B01	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	B04	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	C01	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGTT	123	C04	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D01	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D04	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	E01	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAACT	125	E04	CGTCAAGA	CACACATA	TATGTGTG
102	F01	GCTACGCA	GTTGGTGT	ACACCAAC	126	F04	TTCGCGCA	CGTCAAGA	TCTTGACG
103	G01	TCAACTGC	GCTACGCA	TGCGTAGC	127	G04	CGACTACG	TTCGCGCA	TGCGCGAA
104	H01	AAGCGAAT	TCAACTGC	GCAGTTGA	128	H04	GAAGGTAT	CGACTACG	CGTAGTCG
105	A02	GTGTTACA	AAGCGAAT	ATTCGCTT	129	A05	TTGGCATG	GAAGGTAT	ATACCTTC
106	B02	CAAGCCAT	GTGTTACA	TGTAACAC	130	B05	CGAATTCA	TTGGCATG	CATGCCAA
107	C02	CTCTCGTG	CAAGCCAT	ATGGCTTG	131	C05	TTAGTTGC	CGAATTCA	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	TCTCGCAG	139	C06	ATTGAGCT	TCACTGTG	CACAGTGA
116	D03	ATCATGCG	CAACCAAC	GTTGGTTG	140	D06	GATAGAGA	ATTGAGCT	AGCTCAAT
117	E03	TCTGAGTC	ATCATGCG	CGCATGAT	141	E06	TCTAGAGC	GATAGAGA	TCTCTATC
118	F03	TCGCCTGT	TCTGAGTC	GACTCAGA	142	F06	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	G03	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCGA	143	G06	CTTCACGT	GAATCGCA	TGCGATTG
120	H03	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	H06	CTCCGGTT	CTTCACGT	ACGTGAAG

6. リファレンス

表 50 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 #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
145	A07	TGTGACTA	CTCCGGTT	AACCGGAG	169	A10	CGCTCAGA	CTAACAAG	CTTGTTAG
146	B07	GCTTCCAG	TGTGACTA	TAGTCACA	170	B10	TAACGACA	CGCTCAGA	TCTGAGCG
147	C07	CATCCTGT	GCTTCCAG	CTGGAAGC	171	C10	CATACTTG	TAACGACA	TGTCGTTA
148	D07	GTAATACG	CATCCTGT	ACAGGATG	172	D10	AGATACGA	CATACTTG	CAAGTATG
149	E07	GCCAACAA	GTAATACG	CGTATTAC	173	E10	AATCCGAC	AGATACGA	TCGTATCT
150	F07	CATGACAC	GCCAACAA	TTGTTGGC	174	F10	TGAAGTAC	AATCCGAC	GTCGGATT
151	G07	TGCAATGC	CATGACAC	GTGTCATG	175	G10	CGAATCAT	TGAAGTAC	GTACTTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTGC
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	TGTTCCGC
157	E08	GAGTAAGA	ATAGCGTT	AACGCTAT	181	E11	AGAACCGT	TACGGTTG	CAACCGTA
158	F08	CTGACACA	GAGTAAGA	TCTTACTC	182	F11	AGGTGCTT	AGAACCGT	ACGGTTCT
159	G08	ATACGTGT	CTGACACA	TGTGTCAG	183	G11	ATCGCAAC	AGGTGCTT	AAGCACCT
160	H08	GACCGAGT	ATACGTGT	ACACGTAT	184	H11	GCCTCTCA	ATCGCAAC	GTTGCGAT
161	A09	GCAGTTAG	GACCGAGT	ACTCGGTC	185	A12	TCGCGTCA	GCCTCTCA	TGAGAGGC
162	B09	CGTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	B12	GAGTGCGT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	C09	CGTTAACG	CGTTCGTC	GACGAACG	187	C12	CGAACACT	GCATAAGT	ACTTATGC
164	D09	TCGAGCAT	CGTTAACG	CGTTAACG	188	D12	TAAGAGTG	AGAAGACG	CGTCTTCT
165	E09	GCCGTAAC	TCGAGCAT	ATGCTCGA	189	E12	TGGATTGA	TAAGAGTG	CACTCTTA
166	F09	GAGCTGTA	GCCGTAAC	GTTACGGC	190	F12	AGGACATA	TGGATTGA	TCAATCCA
167	G09	AGGAAGAT	GAGCTGTA	TACAGCTC	191	G12	GACATCCT	AGGACATA	TATGTCCT
168	H09	CTAACAAG	AGGAAGAT	ATCTTCCT	192	H12	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

表 51 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193-240、緑色の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
193	A01	GTCTCTTC	GAAGCCTC	GAGGCTTC	217	A04	GCGGTATG	CACGAGCT	AGCTCGTG
194	B01	AGTCACTT	GTCTCTTC	GAAGAGAC	218	B04	TCTATGCG	GCGGTATG	CATACCGC
195	C01	AGCATACA	AGTCACTT	AAGTGACT	219	C04	AGGTGAGA	TCTATGCG	CGCATAGA
196	D01	TCAGACAA	AGCATACA	TGTATGCT	220	D04	CACAACTT	AGGTGAGA	TCTCACCT
197	E01	TTGGAGAA	TCAGACAA	TTGTCTGA	221	E04	TTGTGTAC	CACAACTT	AAGTTGTG
198	F01	TTAACGTG	TTGGAGAA	TTCTCCAA	222	F04	TCACAAGA	TTGTGTAC	GTACACAA
199	G01	CGTCTGTG	TTAACGTG	CACGTATA	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	AAGGTACT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GACTGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTACT	AGTACCTT
205	E02	CAGTGAGC	AAGCACAA	TTGTGCTT	229	E05	GAGTCCTA	CACTAAGT	ACTTAGTG
206	F02	GTCGAAGT	CAGTGAGC	GCTCACTG	230	F05	AGTCCTTC	GAGTCCTA	TAGGACTC
207	G02	TCTCATGC	GTCGAAGT	ACTTCGAC	231	G05	TTAGGAAC	AGTCCTTC	GAAGGACT
208	H02	CAGAAGAA	TCTCATGC	GCATGAGA	232	H05	AAGTCCAT	TTAGGAAC	GTTCTCTA
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

6. リファレンス

表 52 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 241-288、緑色の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
241	A07	AAGAGACA	TGCTTACG	CGTAAGCA	265	A10	CAATGCTG	CATGAATG	CATTCATG
242	B07	TAGCTATG	AAGAGACA	TGTCTCTT	266	B10	CTTGATCA	CAATGCTG	CAGCATTG
243	C07	TCTGCTAC	TAGCTATG	CATAGCTA	267	C10	GCGAATTA	CTTGATCA	TGATCAAG
244	D07	GTCACAGA	TCTGCTAC	GTAGCAGA	268	D10	GTTCGAGC	GCGAATTA	TAATTCGC
245	E07	CGATTGAA	GTCACAGA	TCTGTGAC	269	E10	GCCAGTAG	GTTCGAGC	GCTCGAAC
246	F07	GAGAGATT	CGATTGAA	TTCAATCG	270	F10	AAGGTCGA	GCCAGTAG	CTACTGGC
247	G07	TCATACCG	GAGAGATT	AATCTCTC	271	G10	AGTGAAGT	CACCTATG	CATAAGTG
248	H07	TCCGAACT	TCATACCG	CGGTATGA	272	H10	GTTGCAAG	ATAACGGC	GCCGTTAT
249	A08	AGAGAGAA	TCCGAACT	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	GTGCGTGA
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 53 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289-226、赤い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
289	A01	AGATAGTG	GATGAGAT	ATCTCATC	313	A04	AGCTACAT	GATCCATG	CATGGATC
290	B01	AGAGGTTA	AGATAGTG	CACTATCT	314	B04	CGCTGTAA	AGCTACAT	ATGTAGCT
291	C01	CTGACCGT	AGAGGTTA	TAACCTCT	315	C04	CACTACCG	CGCTGTAA	TTACAGCG
292	D01	GCATGGAG	CTGACCGT	ACGGTCAG	316	D04	GCTCACGA	CACTACCG	CGGTAGTG
293	E01	CTGCCTTA	GCATGGAG	CTCCATGC	317	E04	TGGCTTAG	GCTCACGA	TCGTGAGC
294	F01	GCGTCACT	CTGCCTTA	TAAGGCAG	318	F04	TCCAGACG	TGGCTTAG	CTAAGCCA
295	G01	GCGATTAC	GCGTCACT	AGTGACGC	319	G04	AGTGGCAT	TCCAGACG	CGTCTGGA
296	H01	TCACCACG	GCGATTAC	GTAATCGC	320	H04	TGTACCGA	AGTGGCAT	ATGCCACT
297	A02	AGACCTGA	TCACCACG	CGTGGTGA	321	A05	AAGACTAC	TGTACCGA	TCGGTACA
298	B02	GCCGATAT	AGACCTGA	TCAGGTCT	322	B05	TGCCGTTA	AAGACTAC	GTAGTCTT
299	C02	CTTATTGC	GCCGATAT	ATATCGGC	323	C05	TTGGATCT	TGCCGTTA	TAACGGCA
300	D02	CGATACCT	CTTATTGC	GCAATAAG	324	D05	TCCTCCAA	TTGGATCT	AGATCCAA
301	E02	CTCGACAT	CGATACCT	AGGTATCG	325	E05	CGAGTCGA	TCCTCCAA	TTGGAGGA
302	F02	GAGATCGC	CTCGACAT	ATGTCGAG	326	F05	AGGCTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGCTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAATCACC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAATCACC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GAATGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GAATGACG	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

6. リファレンス

表 54 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	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000	Primer Pair #	Well	P7 Index	P5 Index NovaSeq (v1.0 chemistry), MiSeq, HiSeq 2500	P5 Index NovaSeq (v1.5 chemistry), NextSeq, HiSeq 4000, HiSeq 3000
337	A07	TGAGACGC	GCCTTCAT	ATGAAGGC	361	A10	CTGAGCTA	GCACAGTA	TACTGTGC
338	B07	CATCGGAA	TGAGACGC	GCGTCTCA	362	B10	CTTGCGAT	CTGAGCTA	TAGCTCAG
339	C07	TAGGACAT	CATCGGAA	TTCCGATG	363	C10	GAAGTAGT	CTTGCGAT	ATCGCAAG
340	D07	AACACAAG	TAGGACAT	ATGTCCTA	364	D10	GTTATCGA	GAAGTAGT	ACTACTTC
341	E07	TTCGACTC	AACACAAG	CTTGTTGT	365	E10	TGTCGTCG	GTTATCGA	TCGATAAC
342	F07	GTCGGTAA	TTCGACTC	GAGTCGAA	366	F10	CGTAACTG	TGTCGTCG	CGACGACA
343	G07	GTTCAATC	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCAATC	GAATGAAC	368	H10	TCGTACAC	GCATGCCT	AGGCATGC
345	A08	ATAAGCTG	AAGCAGTT	AACTGCTT	369	A11	CACAGGTG	TCGTACAC	GTGTACGA
346	B08	GCTTAGCG	ATAAGCTG	CAGCTTAT	370	B11	AGCAGTGA	CACAGGTG	CACCTGTG
347	C08	TTCCAACA	GCTTAGCG	CGCTAAGC	371	C11	ATTCCAGA	AGCAGTGA	TCACTGCT
348	D08	TACCGCAT	TTCCAACA	TGTTGGAA	372	D11	TCCTTGAG	ATTCCAGA	TCTGGAAT
349	E08	AGGCAATG	TACCGCAT	ATGCGGTA	373	E11	ATACCTAC	TCCTTGAG	CTCAAGGA
350	F08	GCCTCGTT	AGGCAATG	CATTGCCT	374	F11	AGACCATT	ATACCTAC	GTAGGTAT
351	G08	CACGGATC	GCCTCGTT	AACGAGGC	375	G11	CGTAAGCA	AGACCATT	AATGGTCT
352	H08	GAGACACG	CACGGATC	GATCCGTG	376	H11	TCTGTCAG	CGTAAGCA	TGCTTACG
353	A09	AGAGTAAG	GAGACACG	CGTGTCTC	377	A12	CACAGACT	TCTGTCAG	CTGACAGA
354	B09	AGTACGTT	AGAGTAAG	CTTACTCT	378	B12	GTCGCCCTA	CACAGACT	AGTCTGTG
355	C09	AACGCTGC	AGTACGTT	AACGTACT	379	C12	TGCGCTCT	GTCGCCCTA	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

表 55 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1-96(オレンジ色のプレート)のプレートマップ

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

表 56 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97-192(青いプレート)のプレートマップ

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

6. リファレンス

表 57 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193-288 (緑色のプレート)のプレートマップ

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

表 58 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289-384 (赤いプレート)のプレートマップ

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

トラブルシューティングガイド

キャプチャ前のライブラリ収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペッティング・混合の特異的な説明が記載されております。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ Ligation Master Mix は、使用する前、必ず 30 ~ 45 分間室温に置いてください(26 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。
- ✓ 固層可逆固定法 (SPRI)による精製ステップに不具合がある可能性があります。精製に用いている AMPure XP ビーズの使用期限をご確認ください。ビーズの保存や操作の条件は、製造元推奨の内容に従ってください。使用前は必ず 30 分以上室温においてください。SPRI の操作では、新しく調製した 70%エタノールを使用してください。
- ✓ SPRI 精製ステップでの DNA の溶出が不完全である可能性があります。サンプル溶出の前の AMPure XP ビーズを過剰に乾燥させないでください。

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

- ✓ 溶液を高速のボルテックスミキサーにて混合し、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。

キャプチャ前のライブラリ断片長が想定と異なる。

- ✓ FFPE 由来 RNA のプレキャプチャライブラリは、インプット RNA 中にターゲットサイズより短い断片が存在するため、小さい断片サイズになることがあります。
- ✓ SPRI 精製で得られる DNA 断片サイズは、サンプルと AMPure XP ビーズの比率に依存します。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、33 ページのキャプチャ前の精製ステップで推奨されている容量を必ず分注してください。

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

- ✓ 想定されるピーク以外に、低分子量のピークがあることは、ライブラリ中にアダプターダイマーが存在している可能性を示唆しています。35 ページの図と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、次のターゲットエンリッチのステップに進んでも問題ありません。それ以上にアダプターダイマーが含まれている場合は、キャプチャ前のライブラリの収量を低下させる可能性があります。アダプターダイマーが多く存在する場合は、アダプターライゲーションの工程が 29 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 XT HS2 RNA 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。

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

6. リファレンス

クル増やし、ライブラリ調製とターゲットエンリッチを再度実施してください。

- ✓ キャプチャライブラリに要因がある可能性があります。使用しているキャプチャライブラリのチューブや Certificate of Analysis に記載されている使用期限を確認してください。保存および取り扱いについては、推奨される内容に従ってください。キャプチャライブラリハイブリダイゼーションミックスは、41 ページの内容にて、使用する直前に調製してください。また、キャプチャライブラリを含む溶液は長時間室温に置かないでください。

得られたキャプチャ後ライブラリの断片長が想定と異なる

- ✓ SPRI 精製で得られる DNA 断片サイズは、サンプルと AMPure XP ビーズの比率に依存します。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（43 ページ参照）
 - ・ 洗浄中はサンプルが 70 °Cで保たれていること（43 ページ参照）
 - ・ 洗浄中は、ピペッティングとボルテックスミキサでビーズが均一な状態に混合されていること（43 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（41 ページのステップ 7 と 8）でサンプルの温度を 65 °Cに保てるように、ボルテックスとチューブやプレートのスピンド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。

Quick Reference Protocol

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 14~52 ページを必ずご覧ください。

Step	Summary of Conditions
RNA Fragmentation and cDNA Preparation	
Prepare and qualify RNA samples	Prepare 10–200 ng total RNA in 10 µl nuclease-free water (high-quality or FFPE samples) For FFPE DNA, qualify integrity as directed on 17 ページ
Fragment RNA and prime cDNA synthesis	Add 10 µl 2× Priming Buffer to each sample. Place FFPE samples on ice (further fragmentation not required). For high-quality samples only , fragment by incubating in thermal cycler: 4 min @ 94°C, 1 min @ 4°C, Hold @ 4°C.
Synthesize first-strand cDNA	20 µl primed RNA fragments + 8.5 µl First Strand Master Mix Incubate in thermal cycler: 10 min @ 25°C, 40 min @ 37°C, Hold @ 4°C
Synthesize second-strand cDNA	28.5 µl first-strand cDNA + 25 µl Second Strand Enzyme Mix + 5 µl Second Strand Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 60 min @ 16°C, Hold @ 4°C
Purify cDNA	58.5 µl cDNA sample + 105 µl AMPure XP bead suspension Elute cDNA in 52 µl nuclease-free H ₂ O, removing 50 µl to fresh well Keep on ice
Library Prep	
Prepare Ligation master mix	Per reaction: 23 µl Ligation Buffer + 2 µl T4 DNA Ligase Keep at room temperature 30–45 min before use
Prepare End-Repair/dA-Tailing master mix	Per reaction: 16 µl End Repair-A Tailing Buffer + 4 µl End Repair-A Tailing Enzyme Mix Keep on ice
End-Repair and dA-Tail the DNA fragments	50 µl cDNA 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 RNA Adaptor Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 30 min @ 20°C, Hold @ 4°C

6. リファレンス

Step	Summary of Conditions
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 Keep on ice
Prepare PCR master mix	Per reaction: 10 µl 5× Herculanase II Reaction Buffer with dNTPs + 1 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 31 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 thermal cycler program on 39 ページ and pause program
Prep DNA in hyb plate	Pool equal amounts of indexed libraries for total of 600 ng library DNA per pool. Adjust volume to 12 µl with nuclease-free H ₂ O (and using vacuum concentrator where needed).
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; start new pause during segment 3 (1 min @ 65°C)
Prepare Hyb Mix	Prepare 25% RNase Block dilution, then prepare appropriate Capture Library Hyb Mix below: Probes ≥3 Mb: 2 µl 25% RNase Block + 5 µl Probe + 6 µl SureSelect Fast Hybridization Buffer Probes <3 Mb: 2 µl 25% RNase Block + 2 µl Probe + 3 µl nuclease-free H ₂ O + 6 µl SureSelect Fast Hybridization Buffer
Run the hybridization	With cycler paused and samples retained in cycler, add 13 µl Capture Library Hyb Mix to wells Resume the thermal cycler program, completing segments 4 (hybridization) and 5 (65°C hold)
Prepare streptavidin beads	Wash 50 µl Streptavidin T1 beads 3× in 200 µl SureSelect Binding Buffer
Capture hybridized libraries	Add hybridized samples (~30 µl) to washed streptavidin beads (200 µl) Incubate 30 min at RT with vigorous shaking (1400-1900 rpm) During incubation, pre-warm 6 × 200 µl aliquots per sample of SureSelect Wash Buffer 2 to 70°C
Wash captured libraries	Collect streptavidin beads with magnetic stand, discard supernatant Wash beads 1× with 200 µl SureSelect Wash Buffer 1 at RT Wash beads 6× with 200 µl pre-warmed SureSelect Wash Buffer 2 (5 minutes at 70°C per wash) Resuspend washed beads in 25 µl nuclease-free H ₂ O

Step	Summary of Conditions
Post-capture amplification	
Prepare PCR master mix	Per reaction: 13 µl nuclease-free H ₂ O + 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs + 1 µl SureSelect Post-Capture Primer Mix + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the bead-bound captured libraries	25 µl DNA bead suspension + 25 µl PCR master mix Amplify in thermal cycler using conditions on 47 ページ
Purify amplified DNA	Remove streptavidin beads using magnetic stand; retain supernatant 50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 25 µl Low TE
Quantify and qualify DNA	Analyze quantity and quality using TapeStation, Bioanalyzer, or Fragment Analyzer System

G210410

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。