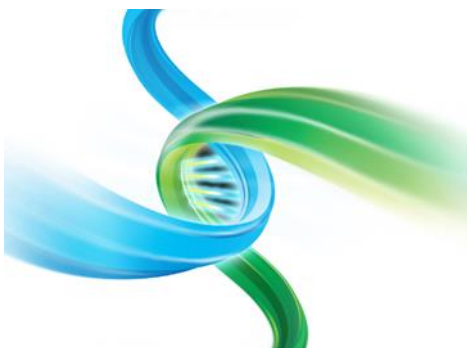
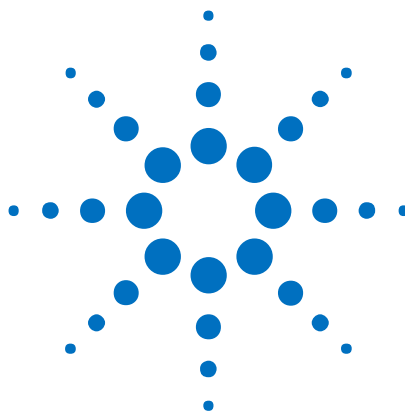




アジレント
SureSelect XT HS
(ポストプール)
ターゲットエンリッチメントシステム

**イルミナペアエンドマルチプレックス
シーケンス対応キット**

和文プロトコル

Protocol Version C2 対応

[2019 年 8 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.

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 HS} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Version C2, July 2019 [G9702-90000] に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント SureSelect XT HS Reagents を用い、イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応したライブラリを調製し、ゲノムの中のターゲット領域をキャプチャするための操作手順を記述しています。SureSelect XT HS 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

1. はじめに

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

2. サンプルの調製

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

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

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

4. キャプチャ後のマルチプレックスシーケンスのためのサンプル調製

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

5. 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。

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。

これまでのバージョンでの変更点

Ver.C2 での変更点

- SureSelect Cancer All-In-One Lung と SureSelect Cancer All-In-One Solid Tumor pre-designed probe panel に対応しました。(p.9 の表 2)
- プロトコルの一部のステップで混合の方法の代わりとしてボルテクスミキサをオプションで使用する内容に対応しました(p.21、p.22、p.23、p.24、p.25、p.30、p.42、p.49)
- (日本語版のみ) ストレプトアビジンビーズの使用温度の記述を変更しました。(p.42. 「ビーズが十分に室温になっていることを確認してください」の記述を削除しました。)
- Illumina 社 NovaSeq platform によるシーケンスの内容に対応しました。(p.9 表 2 下、p.57 - 66)
- NextSeq 500/550 と HiSeq 3000/4000 platform のイルミナ社キット選択ガイドラインの内容をアップデート(p.58 表 31)
- DNA 解析について Agilent 4150 TapeStation の使用に対応しました(p.10 表 4、p.11 表 5)
- MicroAmp film の型番情報をアップデート(p.12 表 6)
- DNA の断片化のステップをアップデート(p.17 Step 2-1、p.17 2 か所の Note)

Ver.C1 での変更点

- SureSelect Cancer All-In-One ワークフローに対応しました。(p.6、p.14、p.58、p.59)
- HiSeq 2500 platform の rapid ランモードで分子バーコードリードをよむ際の注意点をアップデート(p.57、p.58)
- 2100 Bioanalyzer と 4200 TapeStation の使用内容とリファレンスドキュメントをアップデート。(p.32、p.34、p.51、p.53)

Ver.C0 での変更点

- DNA の断片化に、機械による方法の代わりに Agilent Enzymatic Fragmentation kit を用いる内容をサポートしています。(p.11 の表 5、p.13、p.14、p.17、p.19)
- 試薬の混合容量に 24 反応を追加(p.20、p.21、p.27、p.37、p.38、p.46)
- NextSeq platform のシーケンス run set up の内容をアップデート(p.58)
- DNA 断片化の内容に Note を追加(p.18)
- 実験に必要な試薬(p.10 の表 2)、実験に必要な装置(p.11 の表 5)の表の製造メーカーと品番を一部変更
- p.20 の表 11 の Ligation Buffer の表記を修正
- (日本語版のみ) ハイブリダイゼーションとキャプチャの内容に Note を追加(p.37、p.40、p.41)

内容

1. はじめに	6
プロトコル概要	7
操作に関する注意	8
安全に関する注意	8
実験に必要な試薬	9
実験に必要な装置、消耗品類	11
実験に必要な装置、消耗品類 オプション	12
2. サンプルの調製	13
STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認	14
STEP2. DNA の断片化	17
STEP3. 末端修復と dA 付加	20
STEP4. 分子バーコードアダプターのライゲーション	24
STEP5. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製	25
STEP6. アダプター付き DNA ライブラリの増幅	27
STEP7. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製	30
STEP8. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量	32
3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ	36
STEP1. DNA サンプルのキャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション	37
STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製	42
STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収	43
4. 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
STEP1. キャプチャライブラリの増幅	46
STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製	49
STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認	51
STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール	55
STEP5. シーケンスサンプルの調製	57
STEP6. シーケンスの開始とデータ解析	59
5. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用	67
FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更	68
FFPE サンプルの品質確認	68
FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨	69
6. リファレンス	70
キット内容	71
SureSelect XT HS インデックスの塩基配列	74
トラブルシュートガイド	75
クイックリファレンス	78

1. はじめに



1. はじめに

プロトコル概要	7
操作に関する注意	8
安全に関する注意	8
実験に必要な試薬	9
実験に必要な装置、消耗品類	11
実験に必要な装置、消耗品類 オプション	12

最新のプロトコルを参照してください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

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

NOTE

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

NOTE

本プロトコルは、イルミナ社のマルチプレックスペアエンドライブラリ作製プロトコルや、他の SureSelect のプロトコルと異なる点がありますのでご注意ください。各増幅ステップで使用する Primer と、ハイブリダイゼーションで用いる Blocking Agent の種類を間違えないようにご注意下さい。

NOTE

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

NOTE

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

プロトコル概要

SureSelect XT HS ターゲットエンリッチメントのワークフローの概要を図 1 に示します。各ステップに要する時間は表 1 にまとめられています。

図 1 ターゲットエンリッチメントシーケンスライブラリ調製のワークフロー

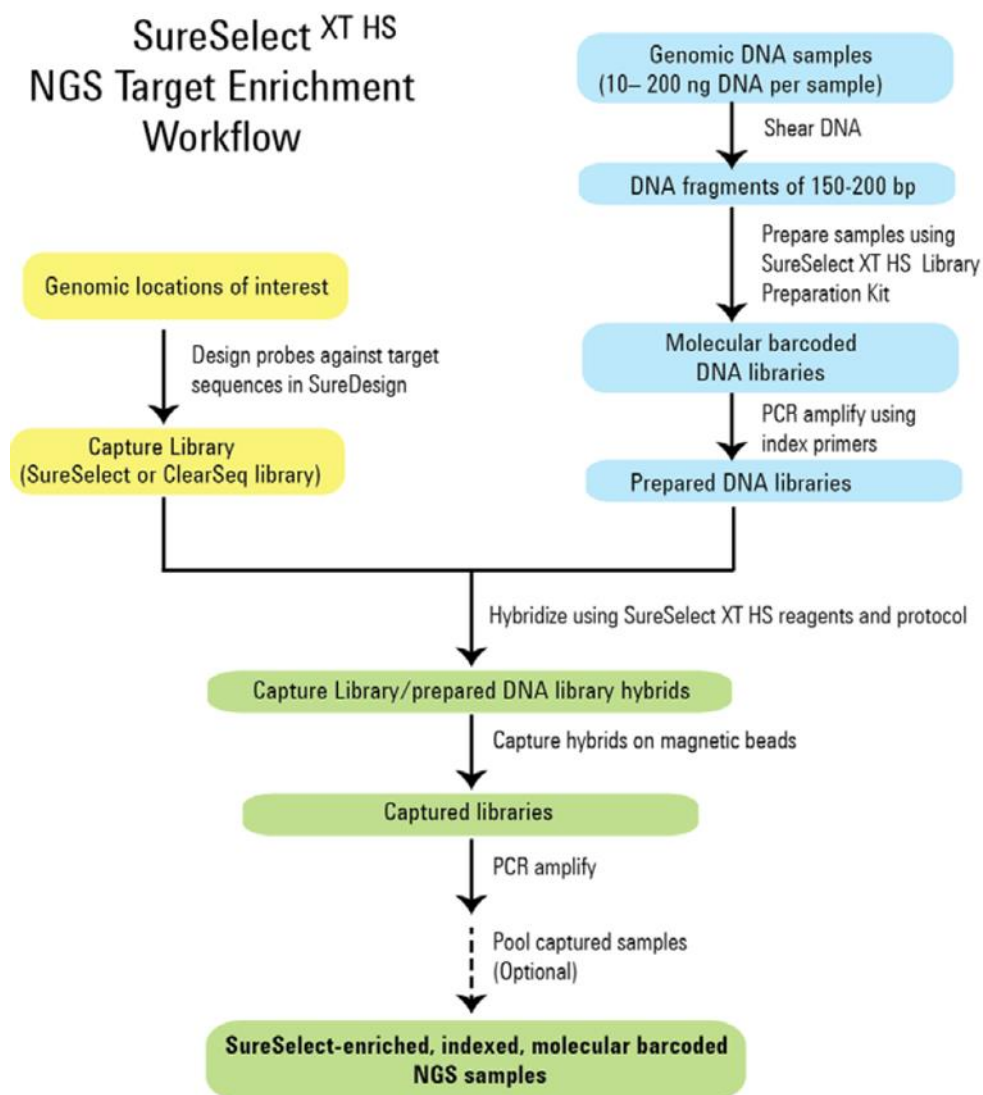


表 1 各ステップの所要時間 概略（16 サンプルまでの場合）

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

1. はじめに

操作に関する注意

- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物のコンタミネーションを防ぐため、以下を実施することをお勧めします。
 1. PCR 前のサンプルを扱う場所と PCR 後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用してください。特に、PCR 後のエリアで使用するものを PCR 前の過程で使用するのは避けて下さい。
 2. 実験スペースは常にクリーンな状態にしてください。PCR 前の過程では作業台を 10% bleach solution やその相当品により、日常的に清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性があるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ Biosafety Level 1 (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-20℃で保存する場合は、サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。
- ・ gDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けてください。

安全に関する注意

CAUTION

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

実験に必要な試薬

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

<http://agilentgenomics.jp> サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイトをご参照ください。

表 2 必要な試薬（全サンプルタイプ）

SureSelect XT HS 試薬キット (Cancer All-In-One Lung、Cancer All-In-One Solid Tumor は試薬キットとキャプチャライブラリのセット品となります)					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
SureSelect XT HS Reagents (index 1-16)*, イルミナ, 16 反応†	Agilent	G9702A	指定	16 反応分	マルチプレックス対応 (index 1-16)
SureSelect XT HS Reagents (index 17-32)*, イルミナ, 16 反応†	Agilent	G9702B	指定	16 反応分	マルチプレックス対応 (index 17-32)
SureSelect XT HS Reagents (index 1-32)*, イルミナ, 96 反応‡	Agilent	G9702C	指定	96 反応分	マルチプレックス対応 (index 1-32 x3)

* HiSeq, MiSeq, NextSeq500, NovaSeq 6000 プラットフォームに対応

† 16 反応のキットには 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。

** インデックスプライマー 1-32 のチューブが 3 セット入っています。

SureSelect キャプチャライブラリ (ペイト)				
品名	製造 メーカー	マニュアル用		自動化用
		16反応分	96反応分	96反応分
SureSelect XT キャプチャライブラリ (ペイト)				
SureSelect XT Human All Exon V7	Agilent	5191-4004	5191-4005	5191-4006
SureSelect XT Human All Exon V6	Agilent	5190-8863	5190-8864	5190-8865
SureSelect XT Human All Exon V6 + UTRs	Agilent	5190-8881	5190-8882	5190-8883
SureSelect XT Human All Exon V6 + COSMIC	Agilent	5190-9307	5190-9308	5190-9309
SureSelect XT Human All Exon V5	Agilent	5190-6208	5190-6209	5190-6210
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs	Agilent	5190-6213	5190-6214	5190-6215
SureSelect XT Human All Exon V5+IncRNA	Agilent	5190-6446	5190-6447	5190-6448
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory	Agilent	931071	931072	931073
SureSelect XT Focused Exome	Agilent	5190-7787	5190-7788	5190-7789
SureSelect XT Clinical Research Exome	Agilent	5190-7338	5190-7339	5190-7344
SureSelect XT Clinical Research Exome V2	Agilent	5190-9491	5190-9492	5190-9493
SureSelect XT Mouse All Exon	Agilent	5190-4641	5190-4642	5190-4643
SureSelect XT Mouse All Exon V2 (mm10 対応)	Agilent	EA	EA	EA
SureSelect XT NCC oncopanel	Agilent	931195	931196	931197
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb*	Agilent	5190-4806	5190-4807	5190-4808
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 再発注*	Agilent	5190-4811	5190-4812	5190-4813
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb*	Agilent	5190-4816	5190-4817	5190-4818
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 再発注*	Agilent	5190-4821	5190-4822	5190-4823
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb*	Agilent	5190-4826	5190-4827	5190-4828
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb, 再発注*	Agilent	5190-4831	5190-4832	5190-4833
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb*	Agilent	5190-4836	5190-4837	5190-4838
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb, 再発注*	Agilent	5190-4841	5190-4842	5190-4843
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb*	Agilent	5190-4896	5190-4897	5190-4898
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb, 再発注*	Agilent	5190-4901	5190-4902	5190-4903
ClearSeq キャプチャライブラリ (ペイト)				
ClearSeq SS Comprehensive Cancer	Agilent	5190-8011	5190-8012	5190-8013
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ	Agilent	5190-7518	5190-7519	5190-7520
Cancer All-In-One キャプチャライブラリ (ペイト)				
Cancer All-In-One Lung	Agilent	試薬とのセットのみ (下表をご覧ください)		
Cancer All-In-One Solid Tumor	Agilent			

EA : Early Access 品です。詳細はお問い合わせ下さい

* Agilent SureDesign アプリケーションでデザインしたカスタム SureSelect Cancer All-In-One パネルを含みます。

SureSelect All-In-One カタログキャプチャライブラリと SureSelect XT HS 試薬キットのセット				
品名	製造メーカー	マニュアル用		
		16 反応分 インデックス 1-16	16 反応分 インデックス 17-32	96 反応分 インデックス 1-32
Cancer All-In-One Lung	Agilent	G9704R	G9705R	G9706R*
Cancer All-In-One Solid Tumor	Agilent	G9704S	G9705S	G9706S*

** 各インデックスプライマー 1-32 をそれぞれ 3 バイアル含む、合計 96 のライブラリを調製

1. はじめに

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
Agencourt 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], 100mL [65603]) もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific	12090-015	相当	100 mL	
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	500 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Thermo Fisher Scientific	AM9930	相当	500 mL	DEPC処理ではないこと
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850	指定	100 assay	スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量する ために用います。 大容量タイプ(500 assays [Q32853]) もあります。

表 3 必要な試薬 (FFPE DNA サンプルのみ)

その他の試薬 (FFPE DNA サンプルのみ)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)	指定	16反応分 または 96反応分	FFPE由来DNAサンプルの場合、 ゲノムDNA QCに使用します。
Genomic DNA Screen Tape	Agilent	5067-5365	指定	7枚	TapeStation Genomic DNA 解析用の試薬。 スタート時のgDNAの分解度評価に使用します。
Genomic DNA Reagents	Agilent	5067-5366	指定	112サンプル分	
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 Samples	Qiagen	56404	指定		
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093	指定		

表 4 ライブラリ QC 用

ライブラリQC用(お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用もしくはバイオアナライザ用、いずれかの消耗品をご用意下さい。)					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Agilent 4150/ 4200 / 2200 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	112サンプル分	
96-well sample plate	Agilent	5042-8502	指定		
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。

実験に必要な装置、消耗品類

表 5 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
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 TapeStation System	Agilent	G2991AA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Agilent 2200 TapeStation, Agilent 4150 TapeStation [p/n G2992AA] の使用も可能です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		DNAの定性または定量に使用することができます。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要。
その他の装置					
SureCycler 8800 サーマルサイクラ	Agilent	G8800A	相当		HotTop使用
96 well plate module for SureCycler 8800 サーマルサイクラ	Agilent	G8810A	相当		
SureCycler 8800 compatible 96-well tube plates または optical strip tubes	Agilent	410088 または 410092	相当	PCR Plate 25プレート Strip Tubes 120本	
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当	strip caps 120本	
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q33226	指定		スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit assay tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856	指定		QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用してください。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンドウン用。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 スピンドウン用 ・96ウェルプレート用: PlateSpin II (KUBOTA) ・8 strip tubes用: 卓上遠心機 プチチェンジ (ワケンビーテック)
MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003428000	相当		ストレプトアビジンビーズ溶液がウェル内でよく混ざる ように、1,400 - 1,800 rpmで30分以上Mix可能なもの。 フルスカート以外のPCRプレートや 8 strip tubesで使用する場合は別売りのPCRプレート アタッチメントが必要。
MS3.5 96ウェルプレート用アタッチメント	IKA	0003428000	相当		フルスカート以外のPCRプレートや8 strip tubes 使用時に上記MS3デジタルに装着して使用。
Covaris Sample Preparation System*	Covaris (エムエス機器)	Model E220	指定		gDNAをロスなく再現性よく、かつ確実に150-200 bp の長さに断片化するために、Covarisの使用が指定 されています。E220以外のモデルをご使用の場合は製 造元にお問い合わせください。ネブラライザの使用は推 奨しません。
Covaris microTUBE sample holders*	Covaris (エムエス機器)	520045	指定		
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12331D	相当		Dyna-Mag-96 (12331D) (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ー					

* Agilent SureSelect XT HS Enzymatic Fragmentation Kit (p/n 5191-4079) または SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation Kit (p/n 5191-4080) を用いて酵素によりDNA断片化を行う場合は、このDNA断片化の装置は必要ありません。

1. はじめに

実験に必要な装置、消耗品類 オプション

表 6 その他オプションの試薬・装置

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
高品質のgDNAを精製するシステム例: QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304	相当	50サンプル	250サンプル用もあります (p/n 51306)
Ethylene Glycol	Wako	055-00996	相当	500 mL	コロナの冷却水循環溶液に、凍結防止のために添加します。
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		96 well plateのシールに使用。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4311971	相当		PCRの機種によっては、stripキャップのかわりにシールを使用できますが、液が蒸発しやすくなる場合があるので、十分な注意とテストが必要です。HotTop対応のものをお使いください。
AriaMxリアルタイム定量PCRシステム	Agilent	G8830A	相当		FFPE由来DNAサンプルの場合、ゲノムDNA QCに使用します。
AriaMx 96-well plates または optical Tube Strip	Agilent	401490 または 401493	相当		AriaMxリアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。
Mx3000p/Mx3005P Optical Strip caps	Agilent	401425	相当		AriaMxリアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

アジレント製品の保証期間は、箱やチューブの入った小袋あるいはボトルに記載の Expiration date (Exp. date)までです。保証期間を過ぎた製品については欠品等があった場合も交換ができない場合がありますので、製品が納品されたらすぐに内容物を確認して下さい。

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するように計画して下さい。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。

※試薬はそれぞれの反応数分がはいっています。

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



2. サンプルの調製

- STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認 14
- STEP2. DNA の断片化 17
- STEP3. 末端修復と dA 付加 20
- STEP4. 分子バーコードアダプターのライゲーション 24
- STEP5. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 25
- STEP6. アダプター付き DNA ライブラリの増幅 27
- STEP7. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製 30
- STEP8. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量 32

この章では、アジレントの SureSelect XT HS キットを用い、イルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンスプラットフォームでシーケンスする DNA ライブラリを調製する方法を説明します。各サンプルに、それぞれインデックスと分子バーコードを付加します。SureSelect XT HS ターゲットエンリッチメントのワークフロー概要は p. 7 の図 1 をご覧ください。

ライブラリ調製プロトコルは、fresh もしくは fresh frozen サンプルからの高品質の gDNA だけでなく、FFPE サンプルからの低品質の DNA にもお使いいただけます。FFPE サンプルを使用する際は、プロトコル全工程において、一部条件を変更する必要があります。FFPE サンプルを使用する際の変更内容のまとめは、p.67 の「5. 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。

このプロトコルには機械による DNA 断片化の工程が含まれております。装置を用いる方法以外に、アジレントは、ライブラリ調製前に酵素による断片化を行う試薬とプロトコルを推奨しております（G9702-90050 をご覧ください）。酵素により断片化した DNA を準備されていたら、p.20 の「STEP3. 末端修復と dA 付加」から実験を始めてください。

2. サンプルの調製

STEP1. ゲノム DNA サンプルの調製と品質確認

NOTE

このセクションの内容は、gDNA サンプルを機械により断片化するときに用います。酵素により断片化する際は、SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation Kit Protocol [G9702-90050]の調製内容に従ってください。

NOTE

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

- ・ 実験デザインで必要な場合は、実験サンプルとともにリファレンス DNA も必ず調製してください。
- ・ 最良の結果を得るには 50ng 以上の input DNA をお使いください。詳しくは G9702-90100 を参照してください。

Fresh なサンプルからの高品質 gDNA の調製

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

NOTE

gDNA サンプルが、OD260/280 の値が 1.8~2.0 であり高品質であることを確認してください。

2. Qubit BR dsDNA Assay Kit を使用して、各 DNA サンプルの濃度を測定します。Qubit 装置および試薬の使用法につきましては製造元が提供しているプロトコルをご確認ください。
3. ライブラリ調製のために、各 DNA サンプルを 1X Low TE Buffer にて 10 ng~200 ng を 50 µL の容量になるよう調製します。ボルテックスミキサでよく混合し、軽く遠心し液をチューブの底にあつめます。サンプルは氷上に置きます。

Fresh なサンプルから調製した DNA は、その後更なる品質確認操作は不要です。p. 17 の「STEP2. DNA の断片化」に進みます。

FFPE サンプルからの gDNA の調製と品質確認

1. キアゲン社の QIAamp DNA FFPE Tissue Kit と、キアゲン社の Deparaffinization Solution を用いて、製造元が提供しているプロトコルに従い、FFPE 組織片サンプルから gDNA を調製します。最後のステップで、Mini Elute カラムにて、30 µL の Buffer ATE で gDNA を溶出します（2 回）。最終的な溶出液の容量は 60 µL になります。

NOTE

Proteinase K での 1 時間の分解反応後、組織の溶解が不十分な場合は、さらに Proteinase K を 10 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. 以下に示す方法のいずれかを用いて、各 FFPE DNA サンプルの品質 (分解度)を確認します。

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

Agilent NGS FFPE DNA QC Kit では、qPCR ベースのアッセイにより DNA の分解度を調べます。結果として、 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアと、サンプル中の増幅可能な DNA の濃度が得られます。その結果を用いて各サンプルの DNA インプット量を定めることができます。 $\Delta\Delta Cq$ 分解度スコアに基づく DNA インプット量の推奨内容は表 7 をご覧ください。

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 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。キットの使用方法是別途弊社ウェブページをご参照ください。
- $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコア ≤ 1 のサンプルは、すべて step a での Qubit に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。
- $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコア > 1 のサンプルは、すべて Agilent NGS FFPE DNA QC Kit より得られる qPCR に基づく濃度を用いて、インプット DNA の量を決定してください。

表 7 $\Delta\Delta Cq$ DNA 分解度スコアに基づく SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

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

* $\Delta\Delta Cq$ が 1 以下の FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。

10~200 ng に必要な容量を計算するには qPCR による DNA 濃度ではなく、Qubit で測定した濃度を使用します。

2. サンプルの調製

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

Agilent 4200 TapeStation もしくは 2200 TapeStation を用いて Genomic DNA ScreenTape Assay を行い、電気泳動パターンから DNA サンプルの分解度を調べます。このアッセイでは、各サンプルについて DNA Integrity Number (DIN) の値が出力され、低品質 DNA の場合はその値をもとに DNA インプット量を決定します。

- Qubit BR dsDNA Assay Kit を用いて各 gDNA サンプルの濃度を測定します。測定方法は製造元が提供するプロトコルをご参照ください。
- 各 DNA サンプルについて、FFPE gDNA 1 µL を Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay 用に分注します。キットの使用方法は別途弊社ウェブページをご参照ください。
- DIN の値をもとに、表 8 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 8 DNA Integrity Number (DIN) の値に基づく、SureSelect XT HS における DNA インプット量の決定

Protocol Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		DIN > 8*	DIN 3–8	DIN < 3
DNA input for Library Preparation	10 ng to 200 ng DNA, quantified by Qubit Assay	10 ng to 200 ng DNA, quantified by Qubit Assay	Use at least 15 ng for more intact samples and at least 40 ng for less intact samples. Use the maximum amount of DNA available, up to 200 ng, for all samples. Quantify by Qubit Assay.	Use at least 50 ng for more intact samples and at least 100 ng for the least intact samples. Use the maximum amount of DNA available, up to 200 ng, for all samples. Quantify by Qubit Assay.

* DIN が 8 より大きい FFPE サンプルの場合、FFPE ではないサンプルと同様に DNA インプット量を決定してください。

- ライブラリ調製のために、各 DNA サンプルを 1X Low TE Buffer にて適したインプット量を 50 µL の容量になるよう調製します。DNA の分解度に基づいて、表 7 と表 8 に記載されている FFPE サンプル用のインプット量推奨内容を参照してください。

ボルテックスミキサーでよく混合し、軽く遠心し液をチューブの底にあつめます。

サンプルは氷上に置きます。

STEP2. DNA の断片化

NOTE

このセクションの DNA の断片化のステップは、Agilent SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation キットを用いて酵素により DNA を断片化することも可能です(プロトコルは G9702-90050 参照)。

このステップでは、50 μ L の gDNA サンプルを、高品質もしくは FFPE の DNA のいずれかに最適化された条件により断片化します。断片化後の DNA のターゲットサイズは 150~200 bp です。

NOTE

本プロトコルは、150-200 bp を DNA 断片化のターゲットサイズとし Covaris model E220 装置と 130 μ L Covaris microTUBE (p/n 520045)により条件が最適化されています。他の Covaris 装置やサンプルホルダーを用いる場合、もしくは使用する NGS ワークフローが異なる DNA 断片のサイズを必要とする場合(例: SureSelect Cancer All-In-One Assay を用いた translocation 検出)、ターゲットサイズの DNA 断片が得られる条件について、装置取り扱い会社にお問い合わせください。

1. コバリス E220 を起動します。
 - a. 製造元の推奨に従い、使用する機器モデル、サンプルチューブまたはプレートでの最適なレベルまで脱イオン水をコバリスのタンクに注ぎます。
 - b. チューブのガラス部分が水で覆われているか確認してください。
 - c. コントロールパネル上で、Degas (脱ガス) ボタンを押します。製造元の推奨に従い装置の脱ガスを行います。(通常 30 分-60 分ほどです。)
 - d. コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C ~ 5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
 - e. (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20% [v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。

コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。

2. 各 gDNA サンプルを、下記の手順にて断片化します。

高品質 DNA サンプルもしくは FFPE DNA サンプルは、50 μ L の 1X Low TE Buffer に 10~200 ng gDNA が含まれている必要があります(必要量は DNA の分解度により決定します)。

NOTE

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

2. サンプルの調製

- a. 先がテーパー状になったピペットチップを用い、コバリスの microTUBE のキャップ上面にあるスリットにチップの先を差し込んで、50 µL DNA サンプルを Covaris microTUBE に移します。
- b. microTUBE を 30 秒遠心し、液を底に集め、底部にある泡を取り除きます。microTUBE 内に泡が残らないように注意してください(泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します)。

【microTUBE の遠心操作】卓上遠心機の PCR チューブ用のアタッチメントにセットし



て軽くスピンドウンします。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 9 の設定により、gDNA の断片化を行います。

表 9 Covaris E-series 装置による断片化設定条件 (SonoLab software v7 以降)

3. 設定	高品質 DNA	FFPE DNA
Duty Factor	10%	10%
Peak Incident Power	175.0	175.0
Cycles / Burst	200	200
Treatment 時間	2x120 sec	240 sec
温度	2°C から 8°C	2°C から 8°C

高品質 DNA のみ、下記の手順にて 2 段階で断片化を実施してください。

- ・ 120 秒断片化します。
- ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
- ・ microTUBE を高速のボルテックスミキサにより 5 秒間攪拌します。
- ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
- ・ さらに 120 秒断片化します。
- ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。
- ・ microTUBE を高速のボルテックスミキサにより 5 秒間攪拌します。
- ・ microTUBE を 10 秒間遠心します。

- d. 断片化が終了したら、microTUBE を microTUBE フォルダから取り出し、ローディングステーションの上に載せます。
- e. microTUBE の蓋をしたままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、サンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
- f. 断片化されたサンプル全量（約 50 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。
- 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 のロスを避けることが重要です。microTUBE の中を見て、すべてのサンプルを移したことを確認してください。もし水滴が残っていたら step g を繰り返してください。

2. サンプルの調製

STEP3. 末端修復と dA 付加

ここからの NGS ライブラリ調製プロトコルの内容は、機械により断片化した DNA サンプル (p.14~p.19) と、酵素により断片化した DNA (手順は G9702-90050 を参照) の両方に対応しております。いずれの方法においても、10-200 ng、容量 50 µL の DNA 断片が必要です。

このステップでは表 10 に示す試薬を使用します。表 10 に記載されている各試薬を溶かして混合します。

p.30 のステップで使用するために、Agencort AMPure XP ビーズを冷蔵庫からだし、室温にします。

表 10 使用前に溶かしておく試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	p.22, step 3 p.22, step 4
Ligation Buffer (purple cap or bottle)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	p.21, step 1-a p.21, step 1-b
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	p.22, step 4
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	p.21, step 1-b
Adaptor Oligo Mix (white cap)	SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	p.22, step 4

* May also be labeled as *SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)*.

複数のサンプルを処理する場合は、各ステップで DNA サンプルを入れる前の Master Mix を余剰分を含めて作製してください。8 サンプル分または 24 サンプル分の Master Mix (余剰分含む) の反応液の量を例として各ステップに記載しています。

1. 末端修復反応の開始前に、Ligation Master Mix を調製し、使用前に室温におきます。

- a. Ligation Buffer を溶かし、高速のボルテックスミキサで 15 秒間攪拌し、均一になるまで混合します。

CAUTION

このステップで使用される Ligation Buffer は粘性が非常に高いです。Master Mix の調製の前に、高速のボルテックスミキサで 15 秒間混合します。他の溶液と混合する際は混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15-20 回繰り返すか、もしくは高速のボルテックスで 10-20 秒攪拌することにより、よく混合してください。

本プロトコル中、8 strip tube や 96 well plate をボルテックスで攪拌するときは、上面が平らなボルテックスミキサを使用してください。試薬をボルテックスで攪拌するときは、液が適切に攪拌されていることを目視で確認してください。

- b. 表 11 の試薬を混合し、適切な量の Ligation Master Mix を調製します。

Ligation Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ 1.5 mL エッペンドルフチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。T4 DNA Ligase をゆっくり加えた後 buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15-20 回繰り返すか、もしくはチューブの蓋をシールして高速のボルテックスで 10-20 秒攪拌することにより、よく混合します。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集めます。

p.24 step 3 の工程で使用する前に **30-45 分、室温に置きます。**

表 11 Ligation Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions* (includes excess)	Volume for 24 reactions† (includes excess)
Ligation Buffer (purple cap or bottle)	23 µl	207 µl	575 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	18 µl	50 µl
Total	25 µl	225 µl	625 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

2. サンプルの調製

2. サーマルサイクラのプログラムを、表 12 の内容に設定します（蓋は加熱します）。

プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 12 末端修復と dA 付加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

* サーマルサイクルプログラムでの反応量は 70 µL に設定してください。

3. 溶解した End Repair-A Tailing Buffer を高速のボルテックスミキサで 15 秒間攪拌し均一にします。溶液を目視で確認し、固形物がある場合は、完全に溶解するまでボルテックスミキサによる攪拌を続けます。

CAUTION

このステップで使用する End Repair-A Tailing Buffer は、分注する前に必ず高速のボルテックスミキサで 15 秒間、均一になるまで攪拌する必要があります。他の溶液と混合するときは、混合溶液の少なくとも 80% の液量に設定したピペットでピペッティングを 15-20 回繰り返すか、もしくは高速のボルテックスで 5-10 秒攪拌することにより、よく混合してください。

4. 表 13 を参照に適切な量の End Repair-A Tailing Master Mix を調製します。

End Repair-A Tailing Buffer をピペットでゆっくり吸い上げ 1.5 mL エッペンドルフチューブにいれます。その際、全量がピペットより吐き出されていることを確認してください。End Repair-A Tailing Enzyme Mix をゆっくり加えた後 buffer 溶液で数回ピペッティングを行い、ピペットチップ内の酵素をリンスします。ピペッティングをゆっくり 15-20 回繰り返すか、もしくはチューブの蓋をシールして高速のボルテックスで 5-10 秒攪拌することにより、よく混合します。混合後、チューブを軽く遠心し液を底に集め、氷上に置きます。

表 13 End Repair/dA-Tailing Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	16 µl	144 µl	400 µl
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µl	36 µl	100 µl
Total	20 µl	180 µl	500 µl

5. 50 μ L の断片化 DNA の入った各サンプルチューブ (well) に 20 μ L の End Repair-A Tailing Master Mix を加えます。60 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 well に蓋をし高速のボルテクスで 5-10 秒攪拌することにより、よく混合します。
6. サンプルを軽く遠心し、すぐにプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラに入れます。Play ボタンを押し、表 12 の通り設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します。

2. サンプルの調製

STEP4. 分子バーコードアダプターのライゲーション

1. サーマルサイクラが 4°C Hold のステップになったら、サンプルを氷上に移します。
2. サーマルサイクラのプログラムを、表 14 の内容に設定します（蓋は加熱します）。プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 14 Ligation のサーマルサイクラのプログラム*

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

* サーマルサイクルプログラムでの反応量は 100 μ L に設定してください。

3. 末端修復・dA 付加反応済みの各 DNA サンプル（液量 約 70 μ L）に、Ligation Master Mix（p.21 で調製済み、室温に保存）を 25 μ L 加えます。85 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 well に蓋をして高速のボルテクスで 5-10 秒攪拌することにより、混合します。その後、軽く遠心を行ないます。
4. Adaptor Oligo Mix（白い蓋のチューブ）を 5 μ L、各サンプルに加えます。85 μ L に設定したピペットで 15-20 回ピペッティングを行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテクスで 5-10 秒攪拌することにより、混合します。

NOTE

Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix は必ず step3 と step 4 で示したように別々の工程でサンプルに加えてください。各ステップで加えた後は、必ず混合してください。

5. サンプルを軽く遠心し、すぐにプレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラにいれます。Play ボタンをおし、表 14 のとおり設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します。

NOTE

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

Stopping Point

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

STEP5. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします（ビーズは通常は 4 °C で保存し、決して凍らせないようにしてください）。
2. step 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL（と余剰分）を調製します。

NOTE

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

3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 80 µL を、前項で調製した DNA サンプル（液量 約 100 µL）が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に注意して加えます。ピペッティングを 15-20 回程度行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5-10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます（約 5-10 分間かかります）。
7. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
8. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. step 8 と step 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンし、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 µL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。

2. サンプルの調製

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

NOTE

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

13. 35 μ L の Nuclease-free water を加えます。
14. キャップをして、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。軽くスピンドアウンします。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで約 5 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
17. 上澄み液（液量 約 34.5 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。

NOTE

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

STEP6. アダプター付き DNA ライブラリの増幅

このステップでは、表 15 に示す試薬を使用します。開始前に、表に記載されている試薬を溶かし、氷上に置きます。

表 15 キャプチャ前 PCR 増幅に使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR) [*] , –20°C	Pipette up and down 15–20 times	p.29, step 3
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	p.29, step 3
100 mM dNTP Mix (green cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	p.29, step 3
Forward Primer (brown cap)	SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), –20°C	Vortexing	p.29, step 3
SureSelect XT HS Index Primers A01 through H04 (black-capped tubes)	SureSelect XT HS Index Primers for ILM (Pre PCR) [†] , –20°C	Vortexing	-- p.29, step 5

^{*} May also be labeled as *SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)*.

[†] インデックスプライマーは個別のチューブで 1-16 (A01-H02), 17-32 (A03-H04), 1-32 (A01-H04)のいずれかのセットがキットに含まれています。使用するプライマーのみ溶解してください。

1. 各サンプルに割り当てるインデックスを決めます。このステップで DNA ライブラリの増幅に使用する SureSelect XT HS Index Primer A01 から H04 までの 8 bp のインデックス部分の配列については、「6. リファレンス」の表 42 を参照してください。
同じレーンでシーケンスを行なう各サンプルには、異なるインデックスプライマーを用いてください。

CAUTION

SureSelect XT HS Index Primer は 1 回分ずつが含まれています。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、1 つのライブラリ調製反応に使用した後の各バイアルは廃棄してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

2. サンプルの調製

2. サーマルサイクラのプログラムを、表 16 の内容に設定します(蓋は加熱します)。

プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 16 キャプチャ前 PCR 増幅のためのサーマルサイクラのプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	8 to 14 インプット DNA の品質と量に基づいた サイクル数の推奨については 表 17 をご覧ください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

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

表 17 推奨のキャプチャ前 PCR サイクル数

Quality of Input DNA	Quantity of Input DNA	Cycles
Intact DNA from fresh sample	100 to 200 ng	8 cycles
	50 ng	9 cycles
	10 ng	11 cycles
FFPE sample DNA	100 to 200 ng*	11 cycles
	50 ng	12 cycles
	10 ng	14 cycles

* qPCR で決定した DNA 量または DIN の値を基に決定した DNA 量

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応溶液（ライブラリ DNA 以外の全ての試薬）の調製は、ラボで決められたクリーンエリアもしくは UV 滅菌灯を備えた PCR フード内にて陽圧の環境下で実施してください。

3. 表 18 の内容の試薬を混合して、適切な量のキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix を調製し、氷上に置きます。ボルテックスミキサでよく混合します。

表 18 キャプチャ前 PCR 反応 Master Mix の調製

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

4. 表 18 の内容にて調製したキャプチャ前 PCR 反応 Master Mix 13.5 µL を、PCR プレートもしくは 8 strip tube 中の各精製 DNA ライブラリサンプル（液量 約 34.5 µL）に加えます。
5. 各反応液に、それぞれ適した SureSelect XT HS Index Primer を 2 µL 加えます。
PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、高速のボルテックスミキサで 5 秒間攪拌します。その後、軽くスピンドウンし、液体を底に集め泡を除きます。
6. サンプルをサーマルサイクラに移す前に、サーマルサイクラの Play ボタンを押し表 16 のプログラムを開始し、ブロックの温度を 98°C にします。サーマルサイクラが 98°C に到達したら、すぐにサンプルの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube をサーマルサイクラのブロックにいれ、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。

2. サンプルの調製

STEP7. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ（4℃保存、決して凍らせないようにしてください）を室温に戻しておくようにします。
2. step8 で使用する 70% エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL（と余剰分）を調製します。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 50 µL を、増幅反応液（液量 50 µL）が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に注意して加えます。ピペッティングを 15-20 回程度行うか、もしくは well に蓋をして高速のボルテックスで 5-10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます（約 5 分かかります）。
7. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
8. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. step 8 と step 9 のステップをもう一度繰り返します。
11. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンし、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 µL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37℃のサーマルサイクラにセットして、1-2 分程度 37℃で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。

NOTE

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

13. 15 µL の Nuclease-free water を加えます。
14. キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。

16. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで約 2-3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
17. 上澄み液（液量 約 15 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。

NOTE

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

2. サンプルの調製

STEP8. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量

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

NOTE

どちらの方法でも、目的のライブラリ断片のピークだけではなく、低分子量のピークも確認される場合、ライブラリ中のアダプターダイマーの存在が考えられます。この後の工程であるターゲットエンリッチメントでは、ライブラリからアダプターダイマーを除去する必要ありません。しかし、全ゲノムシーケンス（サポートしているプロトコルは本プロトコルを含めご提供しておりません）の場合は、アダプターダイマーを含むサンプルはさらに SPRI 精製を行なう必要があります。その場合、サンプルを Nuclease-free water で 50 µL に希釈し、p.30「STEP7. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製」の内容にて SPRI 精製を行ってください。

【2100 Bioanalyzer と DNA 1000 アッセイを使う場合】

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

1. Agilent DNA 1000 Kit 操作説明書の内容にて 2100 Bioanalyzer の装置をセットアップします。
2. Agilent DNA 1000 Kit 操作説明書の内容に従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。各サンプル 1 µL をアッセイに用います。チップ調製後 5 分以内に、調製したチップを装置にセットし泳動を開始します。
3. 解析終了後、電気泳動図（electropherogram）により、高品質の DNA の場合は 300 -400 bp、FFPE DNA の場合は約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 2（高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 3（中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 4（低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）に示されています。

目的とされるピーク以外に、低分子領域にピークが生じている場合、アダプターダイマーの存在が示唆されます。p.33 の図 2、図 3、図 4 と同じ程度に、占められている割合が低い場合は、そのライブラリサンプルを用いてターゲットエンリッチメントの工程に進むことができます。その他については p.76 のトラブルシューティング情報を参照してください。

4. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。より高精度に定量するために、濃度が解析試薬の定量範囲内にあることを確認してください。

ハイブリダイゼーション反応には、調製したライブラリが 500-1000 ng 必要です（液量 12 µL）。

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

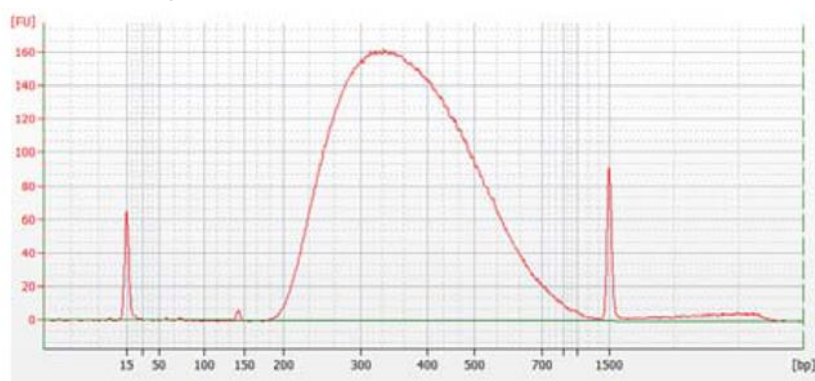


図 3 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図 (DNA 1000 アッセイ)

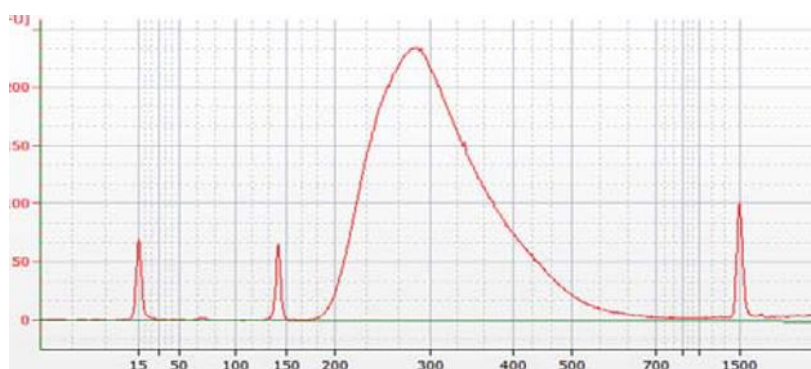
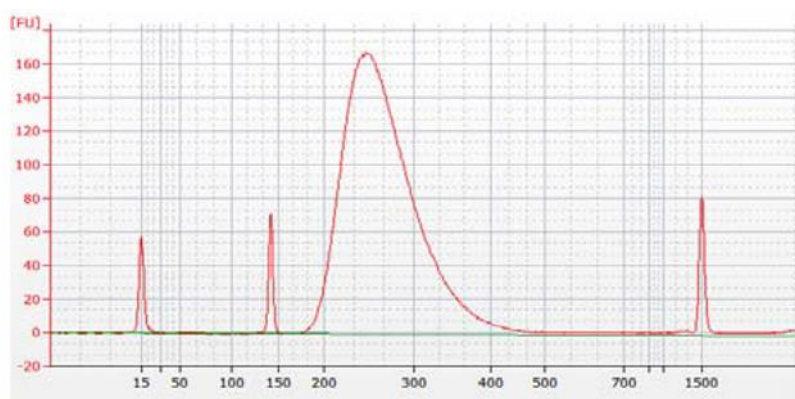


図 4 低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図 (DNA 1000 アッセイ)



Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 4℃で一晩、さらに長期保存の場合は-20℃で保存してください。

2. サンプルの調製

【4200 TapeStation もしくは 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape を使う場合】

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

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

CAUTION

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

2. ユーザマニュアルの内容に従い、Step 1 で調製した sample plate もしくは tube strip、D1000 ScreenTape、Loading tip チップを装置にセットし、泳動を開始します。

解析終了後、電気泳動図 (electropherogram) により、高品質の DNA の場合は 300-400 bp、FFPE DNA の場合は約 200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 5 (高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 6 (中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 7 (低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ) に示されています。

目的とされるピーク以外に、低分子領域にピークが生じている場合、アダプターダイマーの存在が示唆されます。p.34 -35 の図 5、図 6、図 7 と同じ程度に、占められている割合が低い場合は、そのライブラリサンプルを用いてターゲットエンリッチメントの工程に進むことができます。その他については p.76 のトラブルシューティング情報を参照してください。

3. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

ハイブリダイゼーション反応には、調製したライブラリが 500-1000 ng が必要です (液量 12 μL)。

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

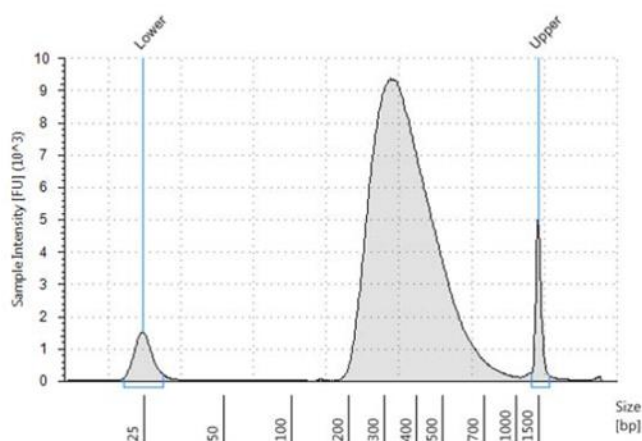


図 6 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
(D1000 ScreenTape アッセイ)

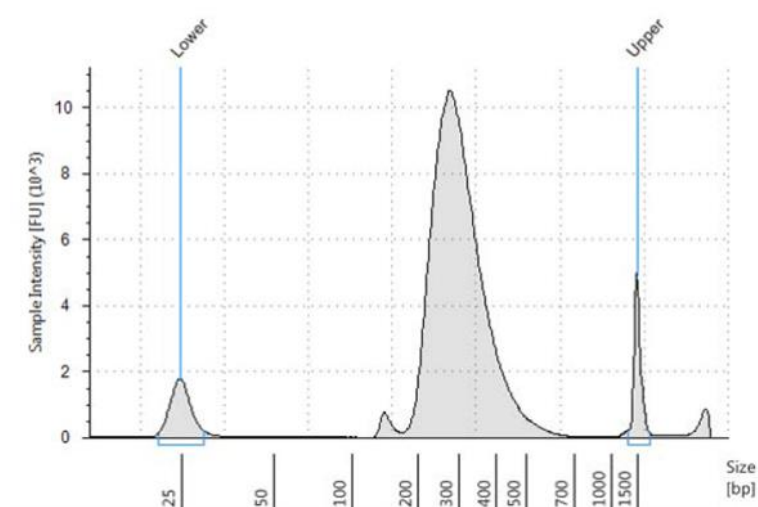
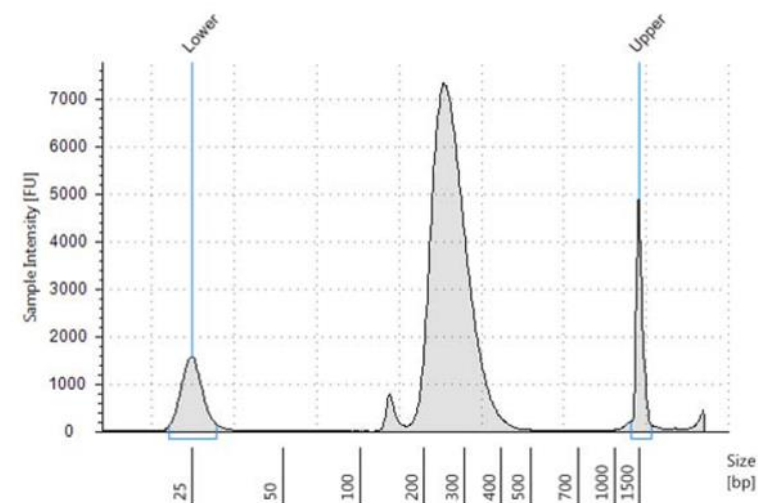


図 7 低品質 FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ前のライブラリの電気泳動図
(D1000 ScreenTape アッセイ)



Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 4℃で一晩、さらに長期保存の場合は-20℃で保存してください。



3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

STEP1. DNA サンプルのキャプチャライブラリへのハイブリダイゼーション 37
STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製 42
STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 43

この章では、前章で調製した gDNA ライブラリとアジレント社 SureSelect キャプチャライブラリを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。各 DNA サンプルはサンプルごとに別々にハイブリダイズしてキャプチャする必要があります。

CAUTION

SureSelect キャプチャライブラリと gDNA ライブラリの比は、高いキャプチャ効率を得るために極めて重要です。プロトコル記載の量に従って、ハイブリダイゼーションを行ってください。

CAUTION

ハイブリダイゼーション中に液の蒸発があると結果に悪い影響を与えます。最初の実験を始める前に、使用するチューブ・プレート・キャップがサーマルサイクラに合っているかどうか確認をし、さらに使用するハイブリダイゼーションの条件で 4 μ L 以上の溶液の蒸発がないか確認してください。

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

このステップでは、調製した gDNA ライブラリを SureSelect キャプチャライブラリとハイブリダイズします。各サンプルで、それぞれハイブリダイズとキャプチャを行ないます。この工程でサンプルをプールしないでください。

ハイブリダイゼーション反応には、調製した gDNA ライブラリが 500-1000 ng が必要です（液量 12 µL）。この範囲内で、なるべく多くの量をハイブリダイゼーションに用いてください。

このステップでは表 19 に示す試薬を使用します。各試薬を表に記載されている条件にて溶解します。各試薬をボルテックスミキサーで攪拌し、軽く遠心をし、液を底に集めます。

表 19 ハイブリダイゼーションに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Where Used
SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix (blue cap)	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR),* -20°C	Thaw on ice	p.38, step 3
SureSelect RNase Block (purple cap)	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR),* -20°C	Thaw on ice	p.39, step 5
SureSelect Fast Hybridization Buffer (bottle)	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR),* -20°C	Thaw and keep at Room Temperature	p.40, step 6
Capture Library	-80°C	Thaw on ice	p.40, step 6

* May also be labeled as *SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)*.

3. 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 20 の内容に設定します（蓋は加熱します）。
プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 20 ハイブリダイゼーションのサーマルサイクラのプログラム*

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

* サーマルサイクルプログラムでの反応量は 30 µL に設定してください (Segment4 のサイクルでの最終反応液量)。

† ハイブリダイゼーションの温度 (Segment 4 と 5) を 60°C に下げることで AT-rich の領域のカバレッジが向上する可能性があります。

2. 各 DNA ライブラリサンプルを 500-1000 ng、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 µL になるように Nuclease-free water を加えます。各 DNA サンプルは 500-1000 ng の範囲内で、なるべく多い量を使用してください。
3. 各 DNA ライブラリサンプルに、SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix を 5 µL 加えます。プレートもしくはチューブに蓋をし、高速のボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し混合します。軽くスピンドウンし液を底に集め泡を除きます。

CAUTION

サーマルサイクラの蓋の温度が熱く、やけどをする恐れがあります。蓋の近くで操作する場合は気をつけて作業してください。

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、Play ボタンをおし、p.39 で表 21 のとおり設定されたサーマルサイクラのプログラムを開始します

重要: p.41 step 7 のステップにて、ハイブリダイゼーションのサンプルチューブに追加で試薬を加えるため、サーマルサイクラを、表 21 のように Segment 3 の間で Pause させる必要があります。

表 20 もしくは表 21 のサーマルサイクラ プログラムの Segment 1、2 の待ち時間に、p.39 -40 の step 5 と step 6 の内容に示された試薬を調製しはじめます。必要に応じて、サーマルサイクラを Segment 3 で pause した後にこれらの調製ステップを完了しても構いません。

表 21 ハイブリダイゼーションのサーマルサイクラのプログラム（Pause を要する Segment を表記）

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 (PAUSE cyclers here)
4	60	65°C	1 minute
		37°C	3 seconds
5	1	65°C	Hold*

* Segment 5 の 65°C Hold がスタートしてから p.42 からのキャプチャステップを始めてください。

NOTE

p.42 STEP 2 でのビーズの調製は Segment 5 よりも早くから調製も可能です。その際はビーズが十分に室温になっていることを確認してください（調製したビーズは同日中であれば使用可能です）。一方、P.43 STEP3 は Segment 5 の 65°C Hold がスタート後、迅速に実施してください（20 分以内）。

5. 表 22 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 22 RNase Block Solution の調製

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

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

NOTE

サーマルサイクラを Segment3 で Pause させる直前に、Step 6 での試薬を調製します。調製した試薬は Step 7 で DNA サンプルに加えるまで室温に置く必要があります、その時間を極力短くするためです。キャプチャライブラリを含む溶液を長時間室温に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、Capture 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 23、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 24 の内容に従ってください。

表に記載されている溶液を室温で混合します。高速のボルテックスミキサーで 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 23 ターゲットサイズ 3 Mb 以上のキャプチャライブラリの場合の Capture Library Hybridization Mix の調製

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

表 24 ターゲットサイズ 3 Mb 未満のキャプチャライブラリの場合の Capture Library Hybridization Mix の調製

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

7. サーマルサイクラのプログラムの Segment 3 (表 21、65°C 1 分間の反応)が始まったら、サーマルサイクラの Pause ボタンを押します。サーマルサイクラを Pause し、step 6 で調製して室温に置いてある Capture Library Hybridization Mix 13 μ L を、DNA と SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix の混合液にサーマルサイクラにセットした状態のままで加えます。ゆっくり 8-10 回ピペッティングしよく混合します。必要に応じてマルチピペットを使用してください。また、作業中はサーマルサイクラ中のサンプルを 65°C に保つようにしてください。
この時点で、ハイブリダイゼーション反応液の液量は 30 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 (必ず新しいキャップを使用してください)。適切なキャッピングツールなどを用いて、全チューブ (well) を確実に密閉します。軽くボルテックスミキサーをし、軽くプレートもしくは 8 strip tube を遠心しチューブ底の泡をのぞき、すぐにサーマルサイクラに戻します。

NOTE

再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用してください。一度使用した Cap Strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。

9. サーマルサイクラの Play ボタンを押し、サーマルサイクラのプログラムを再開し、DNA サンプルをキャプチャライブラリにハイブリさせます。

CAUTION

サンプルが入ったすべてのチューブが確実に密閉されている必要があります。チューブとキャップの間にわずかでも隙間があると液がハイブリ反応中に蒸発して、結果に悪い影響を与えます。

始めて実験を行う前に、使用するチューブ・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。

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

STEP2. ストレプトアビジン磁気ビーズの調製

キャプチャステップの STEP2 以降では表 25 に示す試薬を使用します。

以下のビーズ調製の工程は p.41 step 9 のハイブリダイゼーション反応を開始した後、約 1 時間後にはじめてください。

NOTE

p.42 STEP 2 でのビーズの調製は Segment 5 よりも早くから調製も可能です。
(調製したビーズは同日中であれば使用可能です)。

表 25 キャプチャに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect Binding Buffer	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), * RT	p.42, step 3, 1
SureSelect Wash Buffer 1	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), * RT	p.43, step 7
SureSelect Wash Buffer 2	SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR), * RT	p.43, step 4
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Follow storage recommendations provided by supplier (p.10, 表 2 をご参照ください)	p.42, step 1, 2

* May also be labeled as *SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)*.

- ボルテックスミキサーを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気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。
 - 溶液が透明になるまで 5 分以上静置し、ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。
 - 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

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

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

P.43 STEP3 は Segment 5 の 65°C Hold がスタート後、迅速に実施してください (20 分以内)。

1. ハイブリダイゼーションのステップが完了し、サーマルサイクラが 65°C の Hold ステップ (p.39 表 21 の Segment 5) に到達したら、サンプルをサーマルサイクラから外し、すぐに 2 の作業をはじめます。
2. マルチチャンネルピペットを用いて、各ハイブリダイゼーションサンプルの全量 (約 30 µL) を、洗浄済み磁気ビーズ 200 µL の入ったチューブ (well) に移します。
5-8 回ピペッティングして混合し、プレートもしくは 8 strip tube を新しい 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、1400-1800 rpm で攪拌しながら、室温で 30 分間インキュベーションします。
ビーズがチューブ中を動いて攪拌が行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、以下の手順にて SureSelect Wash Buffer 2 を 70°C に温めます。
 - a. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube を用意し、Wash Buffer 2 を 200 µL ずつ各チューブ (well) に入れます。1 サンプルあたり 6 チューブ準備します。
 - b. プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、70°C で保温したサーマルサイクラ (蓋を加熱) で step 9 まで保温して置きます。
5. step 3 の 30 分間が終了したら、サンプルを軽くスピンドウンし液を底に集めます。
6. プレートもしくは strip tube を磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで静置し、ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。
7. 磁気ビーズに 200 µL の SureSelect Wash Buffer 1 を加え、15-20 回ピペッティングを行い、完全にビーズを再懸濁します。
8. プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます (約 1 分間かかります)。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。

CAUTION

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

SureSelect Wash Buffer 2 が事前に 70°C で温められていることを確認してください。組織培養用のインキュベーターや、その他温度振れ幅の大きい装置は使用しないでください。

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

3. ハイブリダイゼーションとキャプチャ

以下の手順に従い、ビーズを Wash Buffer 2 で洗浄します。

- a. 70°Cで予め温めた Wash Buffer 2 を 200 µL、磁気ビーズに加え、15-20 回ピペッティングを行い、ビーズを完全に懸濁します。
- b. プレートもしくは 8 strip tube を新しい 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。ビーズが固まらない程度の軽い遠心でスピンドウンし、液を底に集めます。

以下の工程に進む前に、必ず液が懸濁されていることを確認します。

- c. サンプルをサーマルサイクラで 70°C、5 分間インキュベーションします（蓋は加熱）。
 - d. プレートもしくは 8 strip tube を室温で磁石スタンドにセットします。
 - e. 1分間静置し、溶液が透明になるまで待ちます。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除いて廃棄します。
 - f. step a～step e をさらに 5 回繰り返します。トータルで洗浄を 6 回行ないます。
10. 全ての wash buffer が取り除かれていることを確認し、Nuclease-free water を 25 µL ずつ、各サンプルに加えます。ピペッティングを 8 回行い、ビーズを再懸濁します。
- p. 48 step 3 で使用するまで、サンプルを氷上に置きます。

NOTE

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



4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

STEP1. キャプチャライブラリの増幅 46

STEP2. AMPure XP ビーズによる増幅キャプチャライブラリの精製 49

STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認 51

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール 55

STEP5. シーケンスサンプルの調製 57

STEP6. シーケンスの開始とデータ解析 59

この章では、キャプチャしたライブラリを増幅、精製、品質確認と定量を行なう工程を示しています。マルチプレックスシーケンスのために、インデックスと分子バーコードが含まれるサンプルをプールする内容も含まれています。

4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

STEP1. キャプチャライブラリの増幅

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

このステップでは表 26 に示す試薬を使用します。表 26 に記載されている各試薬を溶かし氷上に置きます。

表 26 キャプチャ後 PCR 増幅に使用する試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelectXT HS Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	p.48, step 2
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	SureSelectXT HS Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	p.48, step 2
100 mM dNTP Mix (green cap)	SureSelectXT HS Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	p.48, step 2
SureSelect Post-Capture Primer Mix (clear cap)	SureSelectXT HS Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR), -20°C	Vortexing	-- p.48, step 2

* May also be labeled as *SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module Box 2 (Post PCR)*.

DNA ライブラリ 1 種類に対して 1 増幅反応を実施してください。

CAUTION

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

4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

1. サーマルサイクラのプログラムを、表 27 の内容に設定します（蓋は加熱します）。
プログラムを開始し、すぐに Pause ボタンをおし、蓋が設定温度まで加熱されるようにしておきます。

表 27 キャプチャ後 PCR 増幅サーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	9 to 14 キャプチャライブラリのサイズに基づいた サイクル数の推奨については表 28 を ご覧ください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

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

表 28 キャプチャ後 PCR サイクル数の推奨

Capture Library Size/Description	Cycles
Libraries <0.2 Mb	14 cycles
Libraries 0.2–3 Mb (ClearSeq Comp Cancer)	12 cycles
Libraries 3–5 Mb	10 cycles
Libraries >5 Mb (Human All Exon V6 and Clinical Research Exome V2 libraries)	9 cycles

4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

- 表 29 を参照に、適切な量のキャプチャ後 PCR 反応 Master Mix を調製し、氷上に置きます。ボルテックスミキサでよく混合します。

表 29 キャプチャ後 PCR 反応 Master Mix の調製

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

- 表 29 の内容にて調製したキャプチャ後 PCR 反応 Master Mix 25 µL を、ストレプトアビジンビーズに吸着したターゲットエンリッチ DNA (p.44 で調製後、氷上に保存) が 25 µL 入った各サンプルチューブ (well) に加えます。
- PCR 反応チューブ (well) を、ビーズが均一になるまでピペッティングでよく混合します。サンプルがチューブ (well) からあふれないようにしてください。このステップでチューブをスピンドウンしないでください。
- PCR プレートもしくは 8 strip tube に新しい domed strip cap で蓋をします (必ず新しいキャップを使用してください)。サーマルサイクラにセットし、Play ボタンを押し、表 27 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。
ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液 (液量 約 50 µL) を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ（4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。）を室温に戻しておくようにします。
2. step 8 で使用する 70% エタノールを、1 サンプルあたり 400 µL（と余剰分）を調製します。

NOTE

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

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. PCR 増幅後の DNA サンプル（液量 約 50 µL）が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 50 µL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 15-20 回程度行うか、もしくは well にキャップをして高速のボルテックスで 5-10 秒攪拌することにより、液をよく混合します。
ビーズが均一になるまで混合されていることを確認します。各サンプルチューブ（well）が、ビーズの層や透明な部分がない、色が均一な状態であることを確認してください。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。（約 3~5 分間かかります。）
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないようにします。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 µL ずつ加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後、ビーズを吸い込まないように注意してエタノールを取り除きます。
10. step 8 と step 9 のステップをもう一度繰り返します。トータルで 2 回洗浄を行ないます。各サンプルチューブ（well）のエタノールをなるべく全て取り除きます。
11. PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をし、軽くスピンドアウンし残ったエタノールを底に集めます。PCR プレートもしくは tube strip を磁石スタンドにセットし、30 秒静置します。20 µL の容量のピペットを用いて、残りのエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、1-2 分程度 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。

NOTE

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

4. 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

13. 25 μ L の Nuclease-free water を加えます。
14. PCR プレートもしくは 8 strip tube に蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンし液を底に集めます。ビーズを沈殿させないように注意します。
15. 室温で 2 分間インキュベーションします。
16. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで約 2 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
17. 上澄み液（液量 約 25 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。

STEP3. シーケンスライブラリ DNA の定量とサイズ確認

【2100 Bioanalyzer と High Sensitivity DNA アッセイを使う場合】

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

1. Agilent High Sensitivity DNA Kit 操作説明書の内容にて 2100 Bioanalyzer の装置をセットアップします。
2. Agilent High Sensitivity DNA Kit 操作説明書の内容に従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。各サンプル 1 μ L をアッセイに用います。
3. チップ調製後 5 分以内に、調製したチップを装置にセットし、泳動を開始します。
4. 解析終了後、電気泳動図 (electropherogram) により、200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 8 (高品質 DNA から調製したライブラリ)、図 9 (中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ)、図 10 (低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ) に示されています。
5. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。より高精度に定量するために、濃度が解析試薬の定量範囲内にあることを確認してください。

CAUTION

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースラインが不安定になる場合があります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1 μ L に 1x TE を数 μ L 加えて希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1 μ L とって測定することをお勧めします。希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

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

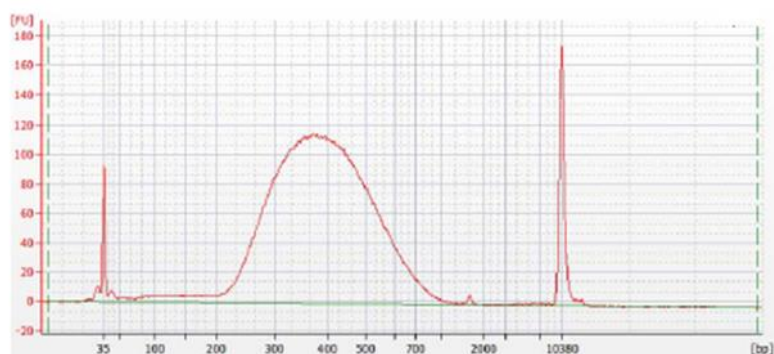


図 9 典型的な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity DNA assay)

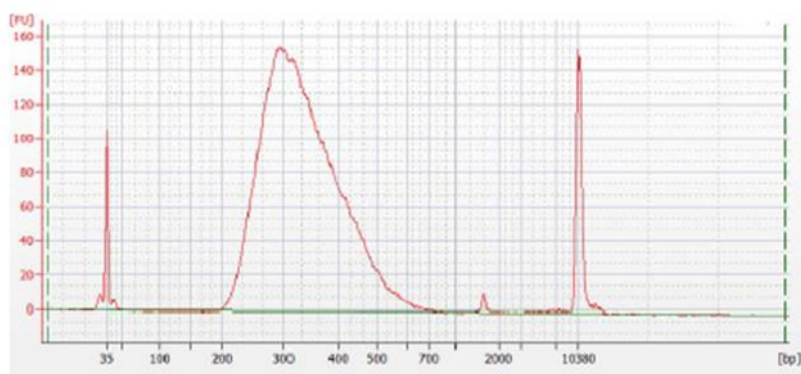
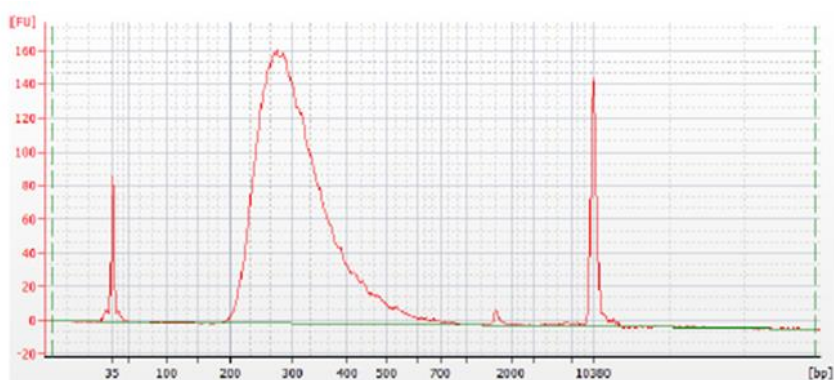


図 10 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ (High Sensitivity DNA assay)



Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 4℃で一晩、さらに長期保存の場合は-20℃で保存してください。

【4200 TapeStation もしくは 2200 TapeStation と High Sensitivity D1000 ScreenTape を使う場合】

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

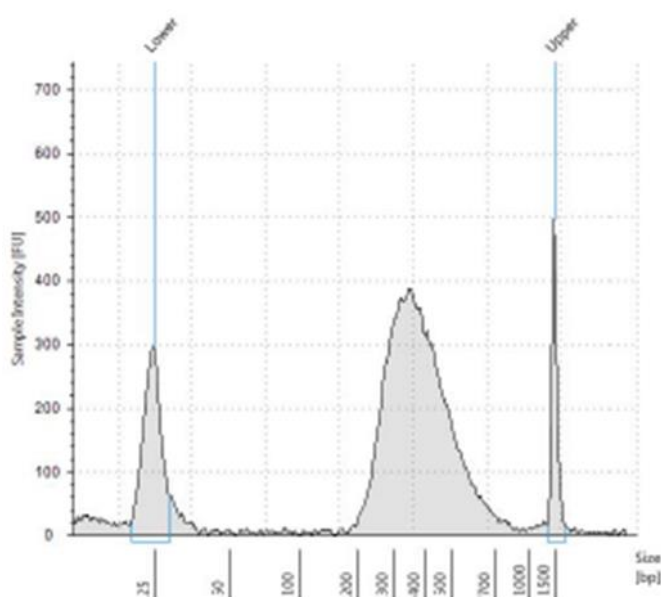
1. ユーザマニュアルの内容に従い、TapeStation のサンプルを調製します。DNA サンプル 2 μ L を High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2 μ L で希釈します。

CAUTION

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

2. ユーザマニュアルの内容に従い、step 1 で調製した sample plate もしくは tube strip、High Sensitivity D1000 ScreenTape、Loading tip チップを装置にセットします。泳動を開始します。
3. 解析終了後、電気泳動図（electropherogram）により、200-400 bp の間に DNA 断片のピークがあることを確認します。電気泳動図の例は図 11（高品質 DNA から調製したライブラリ）、図 12（中程度の品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）、図 13（低品質の FFPE DNA から調製したライブラリ）に示されています。
4. 解析ソフトウェアの Region 機能を用いて、各ライブラリの濃度を確認します。

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



4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

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

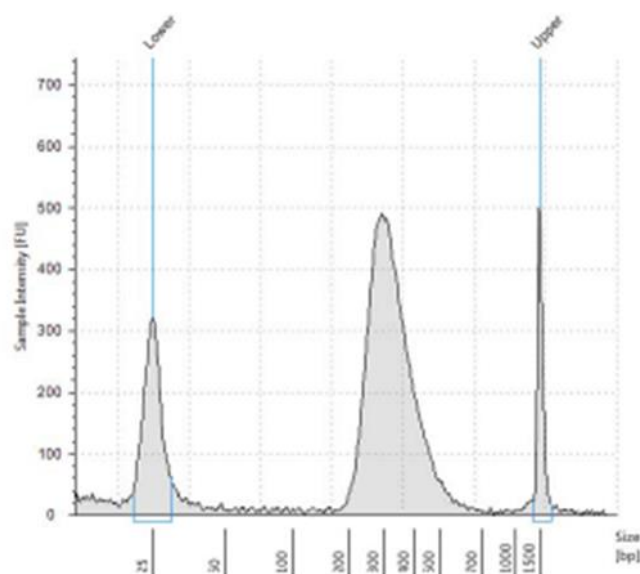
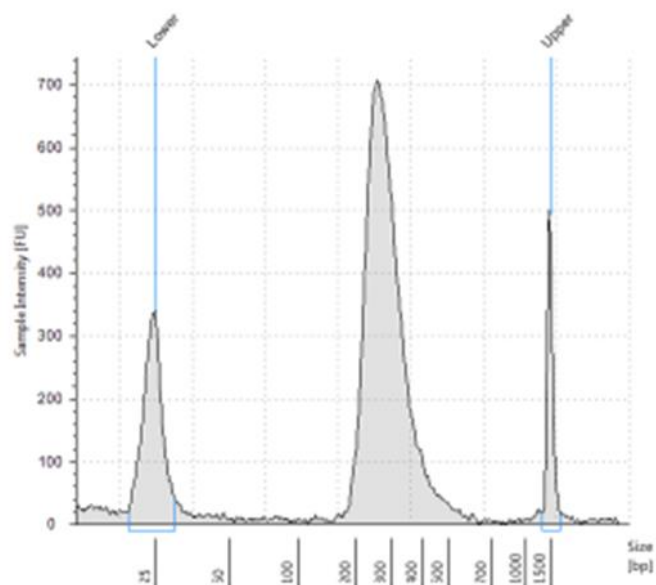


図 13 低品質な FFPE gDNA サンプルから調製したキャプチャ後のライブラリ
(High Sensitivity D1000 ScreenTape assay)



Stopping Point 次のステップに進まない場合は、サンプルの蓋を閉めて 4°C で一晩保存可能です。
(さらに長期保存の場合は -20°C で保存してください。)

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

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

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

方法 1: プールするサンプルそれぞれを、1X Low TE を用いて終濃度が同じになるように希釈します（典型的な濃度は 4 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 30 に 4 種のインデックスサンプル（それぞれ異なる初期濃度）の量と、最終的に 20 µL の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な 1X Low TE の例を示します。

4. マルチプレックスシーケンスのためのキャプチャ後サンプル調製

表 30 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
1X Low TE					7.6

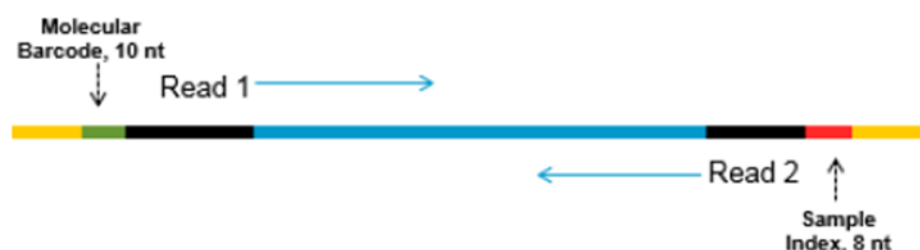
もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 を 0.1% v/v になるように加え、- 20°C で保存します。短期保存に限ります。

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

STEP5. シーケンスサンプルの調製

最終的な SureSelect XT HS ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な Paired-end プライマーとケミストリでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 14 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、1 つのターゲットインサートが、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 14 SureSelect XT HS 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ト(黒)とサンプルインデックス(赤)、分子バーコード(緑)、ライブラリブリッジ PCR プライマ(黄)が付加されています。



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

使用するランタイプとケミストリの組み合わせは表 31 をご覧ください。

CAUTION

解析のパイプラインに分子バーコード(i5)リードを含む場合は、HiSeq2500 の high-output ランモード(v4 chemistry)でシーケンスしないでください。SureSelect XT HS ライブラリを HiSeq2500 装置でこのモードでシーケンスすると、分子バーコードリードのシーケンスデータクオリティが低くなります(Q scores が低くなり、coverage やバリエーションコールの感度に影響します)。HiSeq2500 プラットフォームの別のランモード/chemistry の選択については表 31 をご覧ください。Read 1・Read 2。サンプルレベルインデックス(i7)リードには影響しませんので、分子バーコード解析を省略するアプリケーションではこの装置/ランモード/chemistry の組み合わせを使用できます。

適したイルミナ社 Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスタ増幅に進んでください。推奨するリード長にあったキット仕様は表 31 に示されています。

SureSelect XT HS 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 31 を参照してください。シーディング濃度とクラスタ密度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、

4. 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

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 31 の内容に記載されている範囲の中間のシーディング濃度から最適化を行ってください。

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

表 31 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
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4×50 Cycle Kits*	v3	6–9 pM
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	8–12 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 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‡	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1	230–240 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp‡	300 Cycle Kit	v1	300–500 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp‡	300 Cycle Kit	v1	200–400 pM

* 1 つの 200 cycle kit では 8 bp の i7 と 10 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。

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

‡ これらの platform には 300 Cycle Kit を使用してください。また、SureSelect Cancer All-In-One assay の translocation 検出で推奨されている 2x150 bp リード長のシーケンスにも対応します。

SureSelect Cancer All-In-One assay のシーケンスをセットアップする際は、さらに以下の内容を考慮して下さい。

- ・ Translocation 検出も含む All-In-One assay の場合、Agilent はリード長 2x100 bp 以上、望ましくは 2x150 bp の条件でペアリードシーケンスを実施することを強く推奨します。
- ・ Agilent SureCall アプリケーション (v4.1) の All-In-One Analysis ワークフローでは、現在分子バーコードを用いての duplication リードの除去を行いません。従って、このワークフローで解析するサンプルに関しては特に 10-bp の i5 インデックスリードを取得する必要はありません。

STEP6. シーケンスの開始とデータ解析

以下のガイドラインに従い SureSelect XT HS ライブラリのシーケンスセットアップと解析を実施してください。

- ・ サンプルレベルインデックス (i7)には 8 bp のインデックスリードが必要です。i7 のインデックス塩基配列情報については、p.74 の表 42 をご参照ください。

CAUTION

SureSelect XT HS Index Primer A01 から H04 の 8 bp のインデックス塩基配列は、Agilent SureSelect XT システムのインデックスプライマー A01-H04 の 8 bp インデックス塩基配列とは異なります。

- ・ 分子バーコード(i5)には 10 bp のインデックスリードが必要です。

NOTE

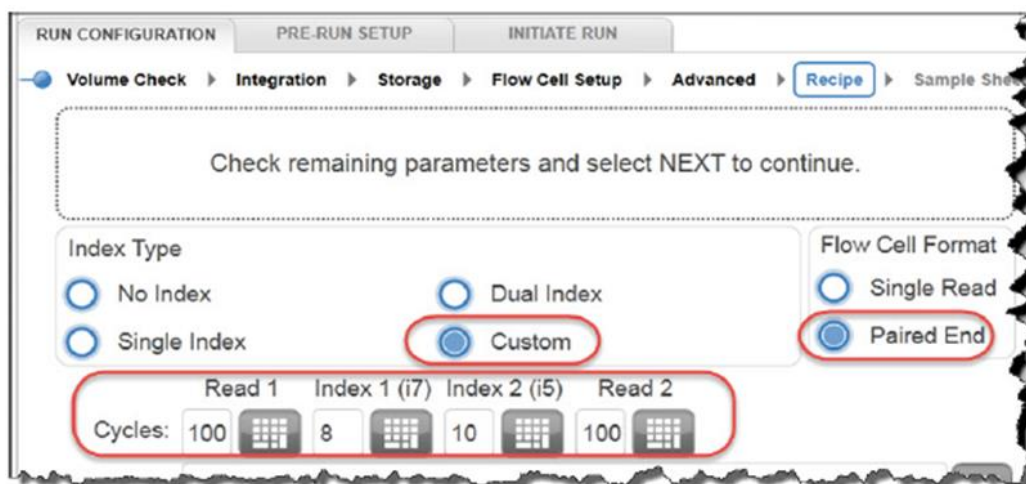
SureCall (v4.1) All-In-One Analysis ワークフローを用いて SureSelect Cancer All-In-One assay の解析を行う場合は、このワークフローには現在分子バーコードを用いた解析が含まれていないため、本項目の内容を変更して i5 インデックスリードを取得して解析する内容を省略することも可能です。

- ・ 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。p.60 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せん。p. 62- 65 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。
- ・ 分子バーコード(i5) インデックスリードが含まれる I2 index ファイルを取得するには、別途.bcl から fastq ファイルへの変換が必要です。その方法については、HiSeq・NextSeq・NovaSeqについては p.60、MiSeq については p.65 をご覧ください。
- ・ リードをリファレンスゲノムに対してアラインメントする前に、リードからイルミナ社アダプター配列を除去する必要があります。Agilent の SureCall ソフトウェアでその作業を行なうことができます。その情報については p.65 をご参照ください。

4. 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

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

装置のコントロールソフトウェアの画面からシーケンスのランセットアップを行ないます。以下は、HiSeq プラットフォームでの 100+100 bp のペアエンドシーケンスのランセットアップの例です。



NextSeq・NovaSeq プラットフォームをお使いの場合は、Run Setup スクリーンで同じパラメータを確認し、上記の HiSeq の例に示されている Cycles の設定を参考に、Read Length の項目に入力してください。NextSeq・NovaSeq プラットフォームの Run Setup スクリーンの Custom Primers の項目では、全ての primer (Read 1, Read 2, Index 1, Index 2) のチェックボックスを外します (選択しないでください)。

現在 BaseSpace では分子バーコードをインデックスリードとしてシーケンスすることをサポートしておりません。スタンドアローンモードで NextSeq のランを設定してください。

分子バーコードが含まれる I2 FASTQ ファイルの取得

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

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

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

1. サンプルシートを使うことが必須です (オプションではありません)。サンプルシートにサンプルインデックスの情報のみを追加します。I5_Index_ID と index2 カラムの内容は消去して分子バーコードの情報は含めません。

2. Mask-short-adapter-reads の数値を 0 にします。
3. Y*, I8, Y10, Y* (*は実際のリード長、つまり RunInfo.xml ファイルのリード長と同じ数値を入力します)

CAUTION

イルミナ社の bcl2fastq ソフトウェアを用いて fastq ファイルを作成するとき、必ず上記に示したように sample sheet 中の index2 カラムの内容を消去してください。分子バーコードとして N₁₀ の文字を入力するのではなく、カラムのセルを空白にしてください。Bcl2fastq ソフトウェアは、sample Sheet の index 配列中の N の文字を wildcard として認識しないため、N を使用すると配列中の N 以外の文字とミスマッチを生じます。

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

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

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

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

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

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

4. 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

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

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM)ソフトウェアを用いてカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT HS インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS システムのインデックス塩基配列につきましては、p.74 の表 42 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に SureCall を使用しているときは、FASTQ Only Workflow-Specific Setting の adaptor-trimming チェックボックスがデフォルトでは選択されているため、両方(下図赤で囲んだ部分)を外します。

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

The screenshot displays the IEM software interface for setting up a FASTQ Only run. The 'FASTQ Only Run Settings' panel on the left includes fields for Reagent Cartridge Barcode, Library Prep Workflow (set to TruSeq Nano DNA), Index Adapters (set to TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)), Index Reads (set to 2 (Dual)), Experiment Name, Investigator Name, Description, Date (1/22/2018), Read Type (set to Paired End), Cycles Read 1 (100), and Cycles Read 2 (100). The 'FASTQ Only Workflow-Specific Settings' panel on the right shows checkboxes for Custom Primer for Read 1, Custom Primer for Index, Custom Primer for Read 2, Reverse Complement, Use Adapter Trimming, and Use Adapter Trimming Read 2. Red boxes highlight the Library Prep Workflow, Index Adapters, Index Reads, Read Type, Cycles Read 1, Cycles Read 2, and the Use Adapter Trimming and Use Adapter Trimming Read 2 checkboxes.

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

同様に、I5 Sequence カラムにも、いずれかの Illumina の i5 インデックスに割り当てます。インデックスは後のステップで分子バーコードとして入力内容を変更します。



Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

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

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

4. 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

SureSelect XT HS のインデックスと分子バーコードを含めるための Sample Sheet の編集

1. Sample sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、カラム 6-9 の i7、i5 のインデックス情報を変更します（図 15、黄色くハイライトされた部分）。
 - ・ 6 番目の i7_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS のインデックス名を入力します。7 番目の index カラムには、適切な SureSelect XT HS のインデックス配列を入力します。SureSelect XT HS のインデックスの塩基配列について、p.74 の表 42 をご覧ください。
 - ・ 8 番目の i5_Index_ID のカラムには、すべてのサンプルに対して「MBC」と入力します。9 番目の index2 カラムには、すべてのサンプルに対して、10 塩基の分子バーコードとして、「NNNNNNNNNN」を入力します。

NOTE

Sample sheet を MiSeq Reporter ソフトウェアで使用する分子バーコードを含む 12 fastq ファイルを作成するときのみ (p.65 参照)、index2 カラムに N₁₀ の文字を入力してください。イルミナ社の bcl2fastq ソフトウェアで sample sheet を用いる場合は N₁₀ の wildcard インデックス配列を含めないでください。（詳細は p.61 参照）

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

[Header]									
ITEMFileVer	5								
Experiment	XTHS								
Date	1/22/2018								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Instrument	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index Adapter	TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)								
Description									
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
	100								
	100								
[Settings]									
ReverseComplement	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	Index_Plate	i7_Index_ID	index	i5_Index_ID	index2	Sample
XTHS-S1	XTHS-S1	1	A01	A01	A01	GTCTGTCA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS
XTHS-S2	XTHS-S2	1	B01	B01	B01	TGAAGAGA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS

2. 編集した Sample Sheet を MiSeq でランを行うために適切な場所に保存します。

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

デフォルトでは MiSeq Reporter ソフトウェアは Index リードの fastq ファイルを出力する設定になっていません。MiSeq Reporter を用いて分子バーコードを含む fastq I2 index ファイルを作成するには、最初に MiSeq で SureSelect XT HS ライブラリのシーケンスを行う前に、ソフトウェアの設定を以下の内容のとおり変更してください。一度変更すると、その設定は保存されますので、次のランでは再設定する必要はありません。

この設定を変更するには、MiSeq Reporter.exe.config ファイルを開き、<appSetting>タグの下に、<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>という 1 文を追加します。この変更を反映するために、装置を再起動してください。

NOTE

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

MiSeqDx プラットフォームをご使用の場合、MiSeq Reporter の設定を変更するために、装置を research モードに変更してご使用ください。もし、research モードへの変更が可能な装置の場合、dual boot configuration に対応したシステムへアップグレードが必要な可能性があります。

p.60 の HiSeq と NextSeq プラットフォームのための I2 fastq ファイルの取得の方法は、MiSeq プラットフォームにも使用できます。

【データ解析リソース】

Agilent の SureCall NGS データ解析ソフトウェアは、SureSelect XT HS ライブラリから得られたシーケンスデータ解析を行うことができます（アダプタトリミング、リードのアラインメント、バリエーションコール）。ソフトウェアは下記ウェブサイトよりダウンロード可能で、無償で使用できます。

www.agilent.com/genomics/surecall

もし他のアラインメントやダウンストリームの解析のパイプラインをお使いの場合、アジレントから Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT)を提供しています。これは、フレキシブルなコマンドラインインターフェースによる、Agilent SureCall の機能を有しており、今お使いのバイオインフォマティクスパイプラインと合わせてお使いいただけます。AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、high-

4. 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

sensitivity (HS) もしくは HS 以外のデータについて、アダプターや低クオリティ塩基のトリミングと、duplicate リードの排除の機能を持ちます。このツールは、インハウスのバイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、さらにこのモジュールは、特に十分なコンピュータインフラ環境下で、AGeNT のアルゴリズムには関係ない様々な問題を解決するための IT サポートをお持ちの方へご使用をお願いしております。アジレントからは AGeNT に関するサポートは限られていますので、Agilent SureCall ソフトウェアのご使用がお勧めです。アジレントは、AGeNT と組み合わせたアップストリーム/ダウンストリームのサードパーティーの解析ツールは保証しておりません。このツールにつきまして、詳細は www.genomics.agilent.com 上、AGeNT のページをご覧ください。



5. Appendix: FFPE 由来 DNA サンプルの使用

FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更 68

FFPE サンプルの品質確認 68

FFPE サンプルにおけるシーケンスアウトプットの推奨 69

この章では、FFPE サンプルからの DNA を用いる際、その分解度に基づいてプロトコルを一部変更する内容をまとめています。

FFPE 由来 DNA サンプルのためのプロトコル変更

FFPE サンプルをお使いの際に、プロトコルに変更を加える内容を表 32 に示します。

表 32 FFPE サンプルのためのプロトコル変更内容一覧

Workflow Step and page	Parameter	Condition for non-FFPE Samples	Condition for FFPE Samples
gDNA Sample Preparation p.14	Qualification of DNA Integrity	Not required	Required
DNA input for Library Preparation p. 15	Input amount and means of quantification	10 ng to 200 ng, quantified by Qubit assay	Based on determined DNA integrity (p. 15 の表 7 と p. 16 の表 8 をご覧ください。)
DNA Shearing p.18	Mode of DNA Shearing	2 × 120 seconds	240 seconds (continuous)
Pre-capture PCR p.28	Cycle number	8–11	11–14
Sequencing p.69	Output augmentation	Per project requirements	1× to 10× based on determined DNA integrity (p.69 の表 33 と表 34 をご覧ください。)

FFPE サンプルの品質確認

DNA の分解度は Agilent NGS FFPE QC Kit もしくは Agilent 4200 TapeStation/2200 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 4200 TapeStation/2200 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。

$\Delta\Delta Cq$ で品質を確認したサンプルの場合:

$\Delta\Delta Cq$ DNA 分解スコアで品質を確認している場合は、表 33 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、 $\Delta\Delta Cq$ 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 33 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

$\Delta\Delta Cq$ value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
<0.5	No extra sequencing output
between 0.5 and 2	Increase sequencing allocation by 2× to 4×
>2	Increase sequencing allocation by 5× to 10× or more

DIN で品質を確認したサンプルの場合:

Genomic DNA ScreenTape アッセイの DIN の値で品質を確認している場合は、表 34 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 34 FFPE 由来の DNA サンプルに関する推奨シーケンスアウトプット

DIN value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
≥ 8	No extra sequencing output
between 3 and 8	Increase sequencing allocation by 2× to 4×
<3	Increase sequencing allocation by 5× to 10× or more

6. リファレンス



6. リファレンス

キット内容 71

SureSelect XT HS インデックスの塩基配列 74

トラブルシュートガイド 75

クイックリファレンス 78

この章では、キットに含まれている試薬内容、インデックス配列、トラブルシュート情報、プロトコルのクイックリファレンス、などリファレンス情報について記載しています。

キット内容

SureSelect XT HS Reagent には以下の内容が含まれています。

表 35 SureSelect XT HS Reagents [G9702A] (16 反応)

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit p/n
SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	−20°C	5500-0138
SureSelect XT HS Index Primers 1–16 for ILM (Pre PCR)	−20°C	5500-0141
SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9685
SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	−20°C	5190-9684

表 36 SureSelect XT HS Reagents [G9702B] (16 反応)

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit p/n
SureSelect XT HS Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	−20°C	5500-0138
SureSelect XT HS Index Primers 17–32 for ILM (Pre PCR)	−20°C	5500-0142
SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9685
SureSelect XT HS Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	−20°C	5190-9684

表 37 SureSelect XT HS Reagents [G9702C] (96 反応)

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit p/n
SureSelect XT HS and XT Low Input Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	−20°C	5500-0140
SureSelect XT HS Index Primers 1–32 for ILM (Pre PCR)	−20°C	5190-9876
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 1 (Post PCR)	Room Temperature	5190-9687
SureSelect XT HS and XT Low Input Target Enrichment Kit ILM Hyb Module, Box 2 (Post PCR)	−20°C	5190-9686

6. リファレンス

表 35～表 37 の表中内容物の、試薬コンテンツを以下に示します。

表 38 SureSelect XT HS Library Preparation Kit (Pre PCR) の内容

Kit Component	16 Reactions (p/n 5500-0138)	96 Reactions (5500-0140)
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
Adaptor Oligo Mix	tube with white cap	tube with white cap
Forward Primer	tube with brown cap	tube with brown cap
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap

表 39 SureSelect XT HS Index Primers Kit (Pre PCR) の内容

Kit Component	16 Reaction Kit, Index Primers 1-16 (p/n 5500-0141)	16 Reaction Kit, Index Primers 17-32 (p/n 5500-0142)	96 Reaction Kit, I Index Primers 1-32 (p/n 5190-9876)
SureSelect XT HS Index Primers (reverse primers containing 8-bp index sequence)	SureSelect XT HS Index Primers A01 through H02, provided in 16 black-capped tubes	SureSelect XT HS Index Primers A03 through H04, provided in 16 black-capped tubes	SureSelect XT HS Index Primers A01 through H04, provided in 96 black-capped tubes (3 vials of each of 32 different primers)

* インデックス配列については、p.74 の表 42 をご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT HS Index Primer は 1 回分ずつが含まれています。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、1 つのライブラリ調製反応に使用した後の各バイアルは廃棄してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

表 40 Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module Box 1 (Post PCR) の内容

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

表 41 SureSelect XT HS Target Enrichment Kit, ILM Hyb Module box 2 (Post PCR) の内容

Kit Component	16 Reactions (p/n 5190-9684)	96 Reactions (5190-9686)
SureSelect Fast Hybridization Buffer	bottle	bottle
SureSelect XT HS and XT Low Input 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
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap

SureSelect XT HS インデックスの塩基配列

SureSelect XT HS Index Primer は、各チューブに 1 回分ずつが含まれています。各チューブには、32 サンプルをランするときに推奨するウェルの位置を意味している Well Reference が記載されております（表 42 参照）。

各インデックスは 8 塩基です。8 塩基のインデックスを用いたライブラリのシーケンスのランセットアップに必要な内容につきましては、p.59 をご覧ください。

表 42 SureSelect XT HS インデックス 1-32（A01-H04）（黒いキャップのチューブ）

Index #	Well Reference	Sequence	Index #	Well Reference	Sequence
1	A01	GTCTGTCA	17	A03	AGCAGGAA
2	B01	TGAAGAGA	18	B03	AGCCATGC
3	C01	TTCACGCA	19	C03	TGGCTTCA
4	D01	AACGTGAT	20	D03	CATCAAGT
5	E01	ACCACTGT	21	E03	CTAAGGTC
6	F01	ACCTCCAA	22	F03	AGTGGTCA
7	G01	ATTGAGGA	23	G03	AGATCGCA
8	H01	ACACAGAA	24	H03	ATCCTGTA
9	A02	GCGAGTAA	25	A04	CCGTGAGA
10	B02	GTCGTAGA	26	B04	GACTAGTA
11	C02	GTGTTCTA	27	C04	GATAGACA
12	D02	TATCAGCA	28	D04	GCTCGGTA
13	E02	TGGAACAA	29	E04	GGTGCGAA
14	F02	TGGTGGTA	30	F04	AACAACCA
15	G02	ACTATGCA	31	G04	CGGATTGC
16	H02	CCTAATCC	32	H04	AGTCACTA

CAUTION

SureSelect XT HS Index Primer A01 から H04 の 8 bp のインデックス塩基配列は、Agilent SureSelect XT システムのインデックスプライマー A01-H04 の 8 bp インデックス塩基配列とは異なります。

トラブルシューティングガイド

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°C 1 時間のインキュベーション後にも組織の塊が存在する場合、Proteinase K 10 µL をさらに追加し定期的な攪拌を行い溶解の状況を確認しながら、56°C のインキュベーションを続けます（追加分、2 時間まで）。サンプル中に組織の塊が見られなくなりましたら、サンプルを室温にうつし、その他のサンプルの溶解がおわるまで室温においておきます。ただし、過剰な分解反応は避けてください。室温に戻した後、各サンプルは、2 時間以内にプロトコルの次のステップに進んでください。また、56°C のインキュベーションを 3 時間以上行わないでください。

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おります。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ Ligation Master Mix は、使用する前、必ず 30-45 分間室温に置いてください(p.21 参照)。
- ✓ PCR サイクル数は最適化が必要な場合があります。再度、そのサンプルについてはキャプチャ前 PCR 反応のサイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製を試してください。ただし、収量の低いサンプルについて、電気泳動図 (electropherogram) 中に高分子量のピーク (>500 bp) が確認される場合、その DNA は増幅過多である可能性が示唆されます。そのサンプルについては、キャプチャ前 PCR のサイクル数を 1~3 サイクル減らしてください。
- ✓ FFPE 組織サンプルを含む、分解しているサンプルから調製した DNA は、過度に分解している場合や、ライブラリ調製を阻害するような修飾をうけている場合があります。Agilent NGS FFPE QC Kit を使用して、サンプル中の増幅可能な DNA の量を精密に測定してインプットする DNA の量を調整してください。
- ✓ 固層可逆固定法 (SPRI) による精製ステップに不具合がある可能性があります。精製に用いている AMPure XP ビーズの使用期限をご確認ください。ビーズの保存や操作の条件は、製造元推奨の内容に従ってください。使用前は必ず 30 分以上室温においてください。SPRI の操作では、新しく調製した 70%エタノールを使用してください。
- ✓ SPRI 精製ステップでの DNA の溶出が不完全である可能性があります。サンプル溶出の前の AMPure XP ビーズを過剰に乾燥させないでください。

6. リファレンス

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

- ✓ 溶液を高速のボルテックスミキサにて混合し、固形物を溶解してください。始めに溶解したときに固形物があっても性能には影響しませんが、その後よく混合して固形物を溶解してからお使いください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より長い

- ✓ 断片化の条件が最適ではない可能性があります。分解していない高品質の DNA については、必ずプロトコルに記載されているとおり、遠心・ボルテックスミキサ含めて 2 段階で断片化を実施してください。
- ✓ microTUBE フィラメント中に泡が入っていると断片化が不完全になることがあります。最初の断片化工程の前に必ず microTUBE を 30 秒遠心して、泡が入っていないことを確認してください。

得られたキャプチャ前ライブラリの断片長が想定より異なる

- ✓ FFPE DNA のキャプチャ前のライブラリには、インプット DNA 中のターゲット断片長より短い DNA の影響により、短いサイズのものが含まれることがあります。
- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、p.30 のキャプチャ前の精製ステップで推奨されている容量を必ず分注してください。

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

- ✓ 想定されるピーク以外に、低分子量のピークがあることは、ライブラリ中にアダプターダイマーが存在している可能性を示唆しています。p.33~35 の図と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、次のターゲットエンリッチのステップに進んでも問題ありません。それ以上にアダプターダイマーが含まれている場合は、キャプチャ前のライブラリの収量を低下させる可能性があります。アダプターダイマーが多く存在する場合は、アダプターライゲーションの工程が p.24 に記載されている内容で実施されているかどうか確認してください。特に、Ligation Master Mix をサンプルと混合してから、その後 Adaptor Oligo Mix を混合する点に注意してください。Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix を同時にサンプルに入れてはいけません。
- ✓ 全ゲノムシーケンス(本プロトコルを含めサポート外)のためには、アダプターダイマーピークが存在するサンプルは、追加で SPRI 精製の実施を推奨します。その際は、サンプルを Nuclease-free water で 50 µL に希釈して、p.30 に記載されている SPRI 精製操作を行ってください。

キャプチャ後ライブラリの収量が低い

- ✓ PCR のサイクル数の最適化が必要な場合があります。キャプチャ後 PCR サイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製とターゲットエンリッチを再度実施してください。
- ✓ キャプチャライブラリに要因がある可能性があります。使用しているキャプチャライブラリのチューブや Certificate of Analysis に記載されている使用期限を確認してください。保存および取り扱いについては、推奨される内容に従ってください。Capture Library Hybridization Mix solution は、p.40 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より異なる

- ✓ SPRI 精製における DNA の断片長による選別は、サンプルと AMPure XP ビーズとが正しい比率で存在している状況で実施されていることに依存しています。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、p.49 のキャプチャ後の精製ステップで推奨されている容量を必ず分注してください。

シーケンスの結果で on-target%が低い

- ✓ ハイブリダイゼーション後の洗浄の stringency が想定より低いことが考えられます。洗浄操作は記載されているとおりに実施してください。その際特に、SureSelect Wash Buffer 2 による洗浄における下記に示した点にご留意ください。
 - ・ SureSelect Wash Buffer 2 が 70°C に予め温められていること (p.43 参照)
 - ・ 洗浄中はサンプルが 70°C で保たれていること (p.43 参照)
 - ・ 洗浄中は、ピペッ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 (p.43 参照)
- ✓ ハイブリダイゼーションの際、ハイブリダイゼーション反応液を室温に晒す時間を最小にしてください。混合して戻すステップ (p.41 の step 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。ハイブリダイゼーションでのサーマルサイクラプログラムについて、Segment 4 と 5 のハイブリ温度を 65°C から 62.5°C もしくは 60°C に下げて (p.38 の表 20 参照)、再度低い stringency の条件でハイブリダイゼーションを行います。

6. リファレンス

クイックリファレンス

略語を用いたプロトコルステップのまとめを以下に示しました。チェックリストとして等、適宜ご利用ください。試薬の混合内容や装置設定など、プロトコル全工程の詳細に慣れるまでは p. 13-66 を必ずご覧ください。

Step	Summary of Conditions
Library Prep	
Prepare and qualify DNA samples	Prepare 10–200 ng gDNA in 50 µl Low TE For FFPE DNA, qualify integrity and adjust input amount as directed on p.15 and p.16
Shear DNA	Use shearing conditions on p. 18 with two rounds of duration 120 seconds for high-quality DNA and single round of duration of 240 seconds for FFPE DNA
Prepare Ligation master mix	Per reaction: 23 µl Ligation Buffer + 2 µl T4 DNA Ligase Keep at room temperature 30–45 min before use
Prepare End-Repair/dA-Tailing master mix	Per reaction: 16 µl End Repair-A Tailing Buffer + 4 µl End Repair-A Tailing Enzyme Mix Keep on ice
End-Repair and dA-Tail the sheared DNA	50µl sheared DNA sample + 20 µl End Repair/dA-Tailing master mix Incubate in thermal cycler: 15 min @ 20°C, 15 min @ 72°C, Hold @ 4°C
Ligate adaptor	70 µl DNA sample + 25 µl Ligation master mix +5 µl Adaptor Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 30 min @ 20°C, Hold @ 4°C
Purify DNA	100 µl DNA sample + 80 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 35 µl nuclease-free H ₂ O
Prepare PCR master mix	Per reaction: 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer + 0.5 µl 100 mM dNTP Mix + 2 µl Forward Primer + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the purified DNA	34.5 µl purified DNA + 13.5 µl PCR master mix + 2 µl assigned SureSelect XT HS Index Primer Amplify in thermal cycler using program on p. 28
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 1 µl using Agilent 2100 Bioanalyzer or 4200 TapeStation instrument

Step	Summary of Conditions
Hybridization/Capture	
Program thermal cycler	Input thermal cycler program on p. 38 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 HS and XT Low Input Blocker Mix Run paused thermal cycler program segments 1 through 3; start new pause during segment 3 (1 min @ 65°C)
Prepare Capture Library Hyb Mix	Prepare 25% RNase Block dilution, then prepare appropriate mixture below: Capture Libraries ≥3 Mb: 2 µl 25% RNase Block + 5 µl Capture Library + 6 µl SureSelect Fast Hybridization Buffer Capture Libraries <3 Mb: 2 µl 25% RNase Block + 2 µl Capture Library + 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 Dynabeads MyOne Streptavidin T1 beads 3× in 200 µl SureSelect Binding Buffer
Capture hybridized libraries	Add hybridized samples (~30 µl) to washed streptavidin beads (200 µl) Incubate 30 min at RT with vigorous shaking (1400-1800 rpm) During incubation, pre-warm 6 × 200 µl aliquots per sample of SureSelect Wash Buffer 2 to 70°C
Wash captured libraries	Collect streptavidin beads with magnetic stand, discard supernatant Wash beads 1× with 200 µl SureSelect Wash Buffer 1 at RT Wash beads 6× with 200 µl pre-warmed SureSelect Wash Buffer 2 (5 minutes at 70°C per wash) Resuspend washed beads in 25 µl nuclease-free H ₂ O
Post-capture amplification	
Prepare PCR master mix	Per reaction: 12.5 µl nuclease-free H ₂ O + 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer + 0.5 µl 100 mM dNTP Mix + 1 µl SureSelect Post-Capture Primer Mix + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the bead-bound captured libraries	25 µl DNA bead suspension + 25 µl PCR master mix Amplify in thermal cycler using conditions on p. 47
Purify amplified DNA	Remove streptavidin beads using magnetic stand; retain supernatant 50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 25 µl nuclease-free H ₂ O
Quantify and qualify DNA	Analyze 1 µl using Agilent 2100 Bioanalyzer or 4200 TapeStation instrument

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

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

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

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

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。

* 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。