アジレント　SureSelect^{QXT} Whole Genome ライブラリ調製

イルミナマルチプレックスシーケンス対応

トランスポゼースを用いたライブラリ調製法

本プロトコルは SureSelect ターゲットエンリッチメントプロトコルとは異なります。ご注意下さい。

和文プロトコル

Protocol Version B.1　対応

［2014 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、最新の英語版を参照くださる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

Protocol
SureSelect^{QXT} Whole Genome Library Prep
for Illumina Multiplexed Sequencing
Version B.1, July 2014
G9682-90000

に対応しています。

このプロトコルでは、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アジレント SureSelect^{QXT} System を用いて、全ゲノムシーケンスのライブラリ調製をするための操作手順を記述しています。SureSelect^{QXT} ターゲットエンリッチメントシステムを用いて、ゲノム中のターゲット領域をキャプチャする場合、本プロトコルではなく、G9681-90000 に相当する和文プロトコルをご参照下さい。

このプロトコルは、イルミナ社マルチプレックスペアエンドシーケンス対応用の SureSelect^{QXT} キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。シングルエンド、マルチプレックスではないペアエンド、メイトペアシーケンス、その他のライブラリには対応していませんので、ご注意ください。

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、gDNA サンプルからの dual-index を付加したライブラリを調製するステップについて説明しています。

3. リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬や消耗品の付加的な注意点について説明しています。

これまでのバージョンでの変更点

Ver B1 での変更点

・シーケンス試薬に関する情報を更新しました。

目次

1. はじめに 6

操作に関する注意 7

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 10

2. サンプルの調製 11

STEP1. Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加 12

STEP2. AMPure XP ビーズによるアダプター付加 gDNA ライブラリの精製 16

STEP3. アダプター付加 gDNA ライブラリの増幅とインデックス付加 18

STEP4. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 20

STEP5. Agilent 2100 バイオアナライザ 高感度 DNA キットによる gDNA ライブラリの定量とサイズ確認 22

STEP6. 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 24

STEP7. クラスタ増幅のためのサンプル調製 26

STEP7. Sequencing Run のセットアップと Read からのアダプタートリミング 30

3. リファレンス 31

試薬一覧 32

SureSelect QXT Dual Index の塩基配列 33

Dual Index 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン 34

1. はじめに

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。

NOTE 本製品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。SureSelect 試薬は納品後 1 年以内にご使用頂きますようお願いします。

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。

操作に関する注意

- SureSelect^{QXT} システムでは、最良の結果を得るためには高品質の DNA サンプルが必要です。実験を開始する前に、DNA の品質を確認して下さい。凍結融解の繰り返しは DNA の品質を下げるため、希釈された DNA は 4℃で保管し、凍結を避けることが理想的です。gDNA を含む溶液は、Vortex で混合しないようにしてください。指でそっとタッピングすることで、液を混合するようにしてください。
- SureSelect^{QXT} によるライブラリ調製プロトコルのパフォーマンスは、DNA サンプルとその他の試薬成分の量のばらつきによって影響を受けます。本プロトコル p.13 に記載してあるように、DNA サンプルを正確に定量し、希釈をすることが重要です。全ての反応試薬は注意深く測り取り、p14. に記載してあるように混合して下さい。正確な量を測り取るために、定期的なピペットのキャリブレーションなど、正確な Liquid Handling を心がけて下さい。
- SureSelect^{QXT} キットに含まれている酵素のマスターミックスは、注意して取り扱って下さい。チューブを-20℃保管から取り出した後、使用中は氷上もしくはコールドブロック中に置いて下さい。使用後はすぐに-20℃のフリーザーに戻してください。
- チューブのストリップキャップを外す必要があるステップでは、再度キャップをする際には新しいストリップキャップを使用して下さい。キャップはサーマルサイクラの Heated Lid に触れる、その他の実験操作などにより変形することがあります。ストリップキャップを再利用することでサンプルをロスしたり、サンプルのコンタミネーションを招いたり、サーマルサイクラでのインキュベーション中にサンプル温度が不正確になったりする可能性があります。
- 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、消耗品と試薬を使用します。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ます。PCR 前の過程ではコンタミネーションのリスクが高いため、10%漂白液で日常的に実験デスクなどを拭き清めて下さい。
    3. PCR 前の溶液専用のピペッタには、ヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用します。
    4. パウダーフリーのラボ用手袋を着用し、表面がコンタミネーションする可能性のあるものに接触したら必ず新しい手袋に替えてください。
- サンプルを-20℃で保管可能な Stopping Point は、プロトコルに記載されています。保管の際は、何回にも渡る凍結融解を繰り返さないようにご注意下さい。
- 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。

- Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

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 1　実験に必要な試薬

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量／1反応あたり	内容量	備考
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	87 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881　60mL，A63882 450mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当		25 mL	最後のライブラリのプール時に必要であれば使用します。
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当		500 mL	DEPC処理ではないこと。
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当			96%以上、分子生物学用グレード　他の有機溶剤のコンタミネーションがないこと。
70% Ethanol (for SPRI clean-up)、molecular biology grade				1.2 mL		上記99.5% Ethanolから調製します。
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	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 dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies	Q32851	指定			BRアッセイでは感度が足りないgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1ラン	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。エキスパートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape	Agilent	5067-5365	推奨	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Agilent TapeStation Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	推奨	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※【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。

実験に必要な装置、消耗品類

表 2　実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	内容量	備考
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定			キャプチャ前後のDNAライブラリの定量とサイズ確認に必要です。Expert Control Software B.02.07以降のversionであること。
Qubit®2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	指定			スタート時のgDNAを正確に定量するために使用。
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当			
Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート用) または日本ジェネティクス　FG-SSMAG2　(8連チューブ用)	Life Technologies または　日本ジェネティクス	96ウェルプレート用　120-27, 8連チューブ用 FG-SSMAG2	相当			96ウェルプレート用マグネット。リング状に磁性ビーズが集まるタイプではなくウェルの一方に磁性ビーズが集まるタイプを推奨。8連チューブで実験をする場合、8連チューブが独立して固定できるもの（日本ジェネティクス　FG-SSMAG2など）。
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plates またはoptical strip tubes	Agilent	410088 または 410092	相当		Tube 120本 Plate 25枚	使用するサーマルサイクラに対応した消耗品をご使用下さい。
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当		120本	使用するサーマルサイクラに対応した消耗品をご使用下さい。
Tube-strip capping tool			相当			PCRチューブのキャップを確実に密閉するために用いると便利です。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当		250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用ください。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
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			多検体を同時に処理する時に便利です。
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						
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						
卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII	相当			
8連チューブ用遠心器	和研ビーテック	プチハチ	相当			8連チューブを使用する場合スピンダウンに必要。
96ウェルプレート 遠心器	KUBOTA	PlateSpin Ⅱ	相当			96ウェルプレートを使用する場合スピンダウンに必要。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
濃縮遠心機（96well plate用ローター付き）	Savant	SC210A	相当			gDNAサンプルが50 ng/uLより低濃度である場合、濃縮の必要があります。
Agilent 2200 TapeStation	Agilent	G2964AA/G2965AA	-			スタート時のgDNAの分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。

2. サンプルの調製

この章では、イルミナプラットフォームで Sequencing を行うためのゲノム DNA(gDNA)の Sequencing ライブラリを調製する方法を記載しています。

NOTE 実験には、OD260/280 の比が 1.8~2.0 の間にある高品質の gDNA を使用ください。できるだけ正確に DNA を定量するために、Qubit システムの使用をお勧めします。

STEP1. Genomic DNA の断片化とアダプタータグの付加

このステップでは、単一の反応により、gDNA を酵素反応により断片化し、各フラグメントの両端にアダプターを付加します。このステップでは、表 3 に示された SureSelect^{QXT} 試薬キットに含まれる試薬と、その他のベンダーの試薬(表 1 参照)を使用します。

表 3 DNA の断片化とアダプター付加の試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
SureSelect QXT Stop Solution	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 1, Room Temperature	p. 12
SureSelect QXT Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p. 14
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p. 14

以下のステップを開始する前に、SureSelect QXT Enzyme Mix ILM と SureSelect QXT Buffer のチューブを、保管してある-20℃のフリーザーから取り出し氷上に置いて下さい。各試薬は使用前にボルテックスでしっかりと攪拌して下さい。AMPure XP ビーズを 4℃から出し、室温に置いて下さい。

NOTE 本ステップで使用する試薬を準備すると同時に、SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2 に含まれる DMSO のチューブも、-20℃から出しておいて下さい。DMSO のチューブは p.18 で使用するまで、室温にて保管して下さい。

シーケンスを行うgDNA サンプルごとに、1ライブラリを調製します。12 サンプルをシーケンスする場合は、12 ライブラリを調製することになります。

1. SureSelect QXT Stop Solution の容器のラベルと以下の説明を確認し、本試薬がエタノールを 25 %含むことを確認して下さい。

   容器を開封して最初に使用する前に、4.5 mL の Stop Solution を含む試薬ボトルに 1.5 mL の 100 %エタノールを加え、最終エタノール濃度が 25 %になるように調製します。ボトルの蓋をきっちりと閉め、ボルテックスミキサでよく攪拌します。エタノールを加えた後は、後で使用する際にエタノール添加済みであることが明確に分かるように、ラベルに印を付けておいて下さい。

   調製済みの 1x SureSelect QXT Stop Solution は p.14 で使用するまで、蓋をきっちりと閉めて室温にて保管します。

2. p.16 と p.20 の精製ステップのための試薬を準備します。

a. 使用する分の AMPure XP ビーズを室温に戻します。使用する少なくとも 30 分以上前に、ビーズを室温に出しておく必要があります。保管時も含め、決して凍らせないようにしてください。

b. 精製で使用する 70%エタノールを、1 サンプルにつき 800 uL (+余剰分)、用時調製します。同じ日に実施する別のステップの精製のための 70%エタノールを、ここで一緒に調製してきっちり密封して置いておくことは出来ますが、エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、調製済み 70%エタノールはその日の内に使い切ることを推奨します。

3. gDNA サンプルを、以下に示すように二段階の手順で、蛍光検出器 Qubit により定量・希釈します。

a. Qubit dsDNA BR Assay を用いて、各 gDNA サンプルの初期濃度を測定します。Qubit の取り扱い説明書を参照して下さい。最適な断片化結果を得るためには gDNA を正確に定量し、適切な量を用いる必要があります。そのためにこの二段階の希釈ステップは、非常に重要です。

b. DNA の吸着が起きにくい LoBind の 1.5 mL チューブを用いて、Nuclease-free 水で各 gDNA サンプルを 50 ng/uL の濃度に希釈します。

c. 再度 Qubit dsDNA BR Assay を用いて、50 ng/uL に調整した gDNA サンプルの濃度を注意深く正確に測定します。

d. c で再測定した濃度をもとに、LoBind の 1.5 mL チューブを用いて、Nuclease-free 水で各 gDNA サンプルの最終的な濃度を 25 ng/uL に調整して下さい。

CAUTION 最適な結果を得るためには、DNA 断片化の時間と温度を正確にコントロールする必要があります。断片化反応の準備を開始する前に、サーマルサイクラが次のステップ 4 に記載の通り設定されていることを確認して下さい。表 4 に記載されている通り、**45℃では 10 分を超過しないようにご注意下さい。**

4. SureCycler 8800 サーマルサイクラ、もしくは相当するサーマルサイクラで、表 4 に示すプログラムを設定します。Heated Lid は On にします。プログラムをスタートさせて直後に Pause を押し、断片化反応の準備をしている間に Heated Lid が指定の温度に達するようにします。

表 4 DNA 断片化のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	45°C	10 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

5. 氷上にある SureSelect QXT Buffer と SureSelect QXT Enzyme Mix ILM を高速設定のボルテックスミキサでよく混合してスピンダウンした後、氷上に置きます。SureSelect QXT Buffer は極めて

2. サンプルの調製

粘性が高いため、完全に且つしっかりと混合することが、最適な断片化のためには極めて重要です。

これらの試薬は-20℃から取り出した時点で液体であり、次のステップ 6 で使用した後はすぐに-20℃に戻して下さい。

CAUTION

以下のステップでは、使用する試薬の僅かな量のばらつきでも、DNA 断片のサイズのばらつきをもたらす可能性があります。

SureSelect QXT Buffer と Enzyme Mix は、極めて粘性が高い溶液です。以下のステップで示されている、分注および混合の方法に沿って実験するようにご注意下さい。最善の結果を得るためには、各試薬および反応溶液を完全に均一に混合することが極めて重要です。

6. 96 ウェル PCR プレートか 8 連ストリップチューブを用いて、氷上で断片化反応溶液を調製します。反応液を構成する各試薬は、以下に示す通りの順序で加える必要があります。SureSelect QXT Buffer と Enzyme Mix はプレミックスにしないで下さい。
   a. 各サンプルウェルに、17 uL の SureSelect QXT Buffer を加えます。
   b. SureSelect QXT Buffer を入れた各ウェルに、ステップ 3 で 25 ng/uL に調整した各 gDNA サンプル 2 uL を加えます。DNA を分注する際、ピペットチップをウェルの底につけて DNA を吐出するように、注意して下さい。
   c. 1 uL の SureSelect QXT Enzyme Mix, ILM を各サンプルウェルに加えます。Enzyme Mix を分注する際、ピペットチップをウェルの底につけて試薬を吐出するように、注意して下さい。1 uL の Enzyme Mix を吐出した後、8-10 回ピペッティングで溶液のアップダウンを行い、粘性の高い試薬溶液がピペットチップに残らず、完全にウェル内に移されるようにして下さい。この時点でウェル内の溶液の合計量は 20 uL になります。
7. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、ストリップチューブまたはプレートごと高速設定のボルテックスミキサで 20 秒間攪拌し、反応溶液が完全に混ざるようにします。**
8. サンプルをスピンダウンし、すぐにストリップチューブまたはプレートを Pause してある SureCycler 8800 などのサーマルサイクラにセットします。Play ボタンを押し、Pause させていた表 4 のサーマルサイクリングプログラムを再開させて下さい。
9. サーマルサイクラ中で 10 分間サンプルをインキュベーションしている間に、p.16 で使用する AMPure XP ビーズをボルテックスミキサでしっかり攪拌し、均一にして下さい。
10. サーマルサイクラが 4℃ 1 分間のインキュベーションを完了したらすぐサンプルを氷上に移し、速やかに下のステップ 11 に進んでください。
11. 32 uL の 1X SureSelect QXT Stop Solution(25%のエタノールを含む状態)をそれぞれの断片化反応液に加えます。ウェルを新しいキャップでしっかり密封し、高速設定のボルテックスミキサで 5 秒

間混合します。軽くスピンダウンして液をウェルの底に集めます。

サンプルを室温で 1 分間インキュベーションします。すぐに p.16 の精製プロトコルに進んで下さい。

STEP2. AMPure XP ビーズによるアダプター付加 gDNA ライブラリの精製

使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4℃保存)を室温に戻しておくようにします。

サーマルサイクラを 37℃に設定しておきます。

下のステップ 6 で使用する 70%エタノールが必要量あることを確認します。

1. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
2. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 **52 uL** を、52 uL の DNA サンプルが入った各ウェルに加えます。**ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ストリップチューブまたはプレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、軽くスピンダウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

   ビーズ溶液の状態や色がサンプルウェル内で均一であることを確認して下さい。ビーズの層や透明な液体のみの箇所が存在せず、均一な色である必要があります。
3. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
4. チューブまたはプレート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（3-5 分間程度）。
5. チューブまたはプレート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ます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
6. チューブまたはプレート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ウェルに 200 uL ずつ加えます。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て下さい。
7. 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 70%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、廃棄します。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。各 Wash ステップで、確実にエタノールが取り除かれるようにして下さい。
9. 37℃にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1-3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
10. **11 uL** の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
11. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、軽くスピンダウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
12. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
13. チューブまたはプレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
14. 上澄み液 約 10 uL を新しいウェルに移し、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。

STEP3.　アダプター付加 gDNA ライブラリの増幅とインデックス付加

このステップでは、アダプター付加された gDNA ライブラリを、適切な組み合わせの Dual Index プライマーを用いて PCR 増幅します。

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 ランプを備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

以下の表にある試薬を溶解し、ボルテックスミキサでよく混合した後、DMSO 以外を氷上に置きます。DMSO は引き続き室温に置きます。

表 5　PCR 増幅とインデックス付加に使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p.18
5× Herculase II Reaction Buffer	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p.18
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p.18
SureSelect QXT P7 and P5 dual indexing primers	SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2, –20°C	p.18
DMSO	Transferred to Room Temperature storage on p. 12	p.18

1 つの gDNA ライブラリに対して、1 つのウェルでインデックス付加 PCR 増幅反応を行います。

1. 各サンプルに付加する適切なインデックスの割り当てを決定します。この DNA ライブラリの増幅ステップで用いる P7・P5 プライマーのインデックス部分の塩基配列については、本書のリファレンスの項に掲載されている表 16 と表 17 を参照して下さい。
   同一レーン上で Sequencing を行うサンプル同士には、異なるインデックスプライマーの組み合わせを使って下さい。

NOTE　シーケンサによる読み取り時のカラーバランスを保つため、サンプルのプールに際しては P7 および P5 プライマーのインデックス部分の塩基の多様性を最大に保つことを推奨します。例えば、8-plex の場合は 8 種類の異なる P7 インデックスプライマーを用い、2 種類の異なる P5 インデックスプライマーを用います。さらに詳細は p.34 の表 18 と表 19 を参照して下さい。

表 6 に従って、サンプル数に応じた PCR 反応液を氷上で調製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリあたり約 1.06 倍の量で計算されています。

2. ボルテックスで、溶液をよく混合します。

表 6　PCR 反応 Mix の調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	22 µL	374 µL
5× Herculase II Reaction Buffer	10 µL	170 µL
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	0.5 µL	8.5 µL
DMSO	2.5 µL	42.5 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL	17 µL
Total	**36 µL**	**612 µL**

3. ステップ 2 で調製した 36 uL の PCR 反応 Mix を、各ウェルに入った精製された gDNA ライブラリ 10 uL に加えます。
4. 各 PCR 反応ウェルに、2 uL の適切な P7 dual indexing プライマー(96 反応キット：P7 i1 から P7 i12 のいずれか、16 反応キット：P7 i1 から i8 のいずれか)を加えます。各ウェルには、12 種類のプライマーのうち 1 種類だけを加えます。
5. 各 PCR 反応ウェルに、2 uL の適切な P5 dual indexing プライマー(96 反応キット：P5 i13 から P5 i20 のいずれか、16 反応キット：P5 i13-i14 のいずれか)を加えます。各ウェルには、8 種類のプライマーのうち 1 種類だけを加えます。
6. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ボルテックスミキサで 5 秒間攪拌した後、スピンダウンします。プレートもしくは 8 連チューブをサーマルサイクラに移して表 7 の PCR プログラムに従って、増幅を行います。この時点で PCR 終了後の精製に用いる AMPure XP ビーズを、室温に戻しておき、70%エタノールを準備しておくと便利です。

表 7　PCR プログラム

Segment Number	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	68°C	2 minutes
2	1	98°C	30 seconds
3	5	98°C	30 seconds
		56°C	30 seconds
		72°C	1 minute
4	1	4°C	Hold

STEP4. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4℃保存)を室温に戻しておくようにします。

サーマルサイクラを 37℃に設定しておきます。

下のステップ 6 で使用する 70%エタノールが必要量あることを確認します。

1. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。決して凍らせないようにしてください。
2. 精製された DNA サンプルを室温に移し、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 **35 uL** を、50 uL の DNA サンプルが入った各ウェルに加えます。**ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ストリップチューブまたはプレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、軽くスピンダウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

   ビーズ溶液の状態や色がサンプルウェル内で均一であることを確認して下さい。ビーズの層や透明な液体のみの箇所が存在せず、均一な色である必要があります。
3. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
4. チューブまたはプレート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（3-5 分間程度）。
5. チューブまたはプレート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ます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
6. チューブまたはプレート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ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 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 70%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、廃棄します。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。各 Wash ステップで、確実にエタノールが取り除かれるようにして下さい。
9. 37℃にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1-3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
10. **30 uL** の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
11. **ウェルを新しいキャップでしっかり密封し**、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、軽くスピンダウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
12. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
13. チューブまたはプレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
14. 上澄み液 約 29 uL を新しい 1.5mL の LoBind チューブに移し、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。

15. 次のステップで電気泳動するために、それぞれの増幅されたライブラリから 1 uL を取り分けます。分析の前に、取り分けた 1 uL のサンプルを 1x Low TE 9 uL で 10 倍に希釈します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4℃で短期間保存できます。長期保管する場合は、-20 ℃で保管することができます。

STEP5. Agilent 2100 バイオアナライザ　高感度 DNA キットによる gDNA ライブラリの定量とサイズ確認

精製した gDNA ライブラリの収量とサイズ分布をバイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを用いて測定します。

NOTE

Agilent バイオアナライザ DNA 1000 キットは、全ゲノムライブラリには使用しないで下さい。全ゲノムライブラリのフラグメントサイズの分布は、DNA 1000 キットの分析範囲に適合しません。エレクトロフェログラム例として図 1 を確認して下さい。

磁性ビーズがサンプルに混入していると、バイオアナライザの測定結果に悪影響を与える可能性があります。サンプルへのビーズのコンタミネーションが疑われる場合、サンプルの入ったプレートやチューブを磁石スタンドにセットし、磁性ビーズを吸わないように上澄を 1 uL 取ってバイオアナライザで分析して下さい。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(**version B.02.07** もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。サンプルは、前ページのステップ 15 で 10 倍に希釈したものを用います。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。
    - 以下の泳動図のように、典型的な全ゲノムライブラリのエレクトロフェログラムは広いサイズ分布の DNA 断片を含みます。
    - バイオアナライザの Region Table に表示される DNA 断片の平均サイズを確認して下さい。実際には広範囲に渡る平均断片サイズのライブラリで、Sequencing データの取得が可能です。しかしながら、このプロトコルは、約 600 bp – 1000 bp の範囲に平均 DNA 断片長がある全ゲノムライブラリを作製するように最適化されており、その範囲から外れる場合以下のような注意が必要です。

NOTE

gDNA ライブラリの平均断片サイズが 600 bp よりもかなり短い場合、最初の断片化ステップに持ち込む gDNA サンプル量が 50 ng より少なかった可能性があり、Duplication Rate の高い Sequencing データとなる可能性があります。逆に gDNA ライブラリの平均断片サイズが異常に長い場合、最初の gDNA サンプルの量が 50 ng より多かった可能性があり、Sequencing 反応の際に最適なクラスタ密度を得るためには通常より高いライブラリ濃度が必要になる場合があります。

8. このピーク全体の濃度をバイオアナライザの Region table 機能を用いて、測定します。正確な定量のためには、得られた濃度がキットの定量範囲内であることを確認して下さい。

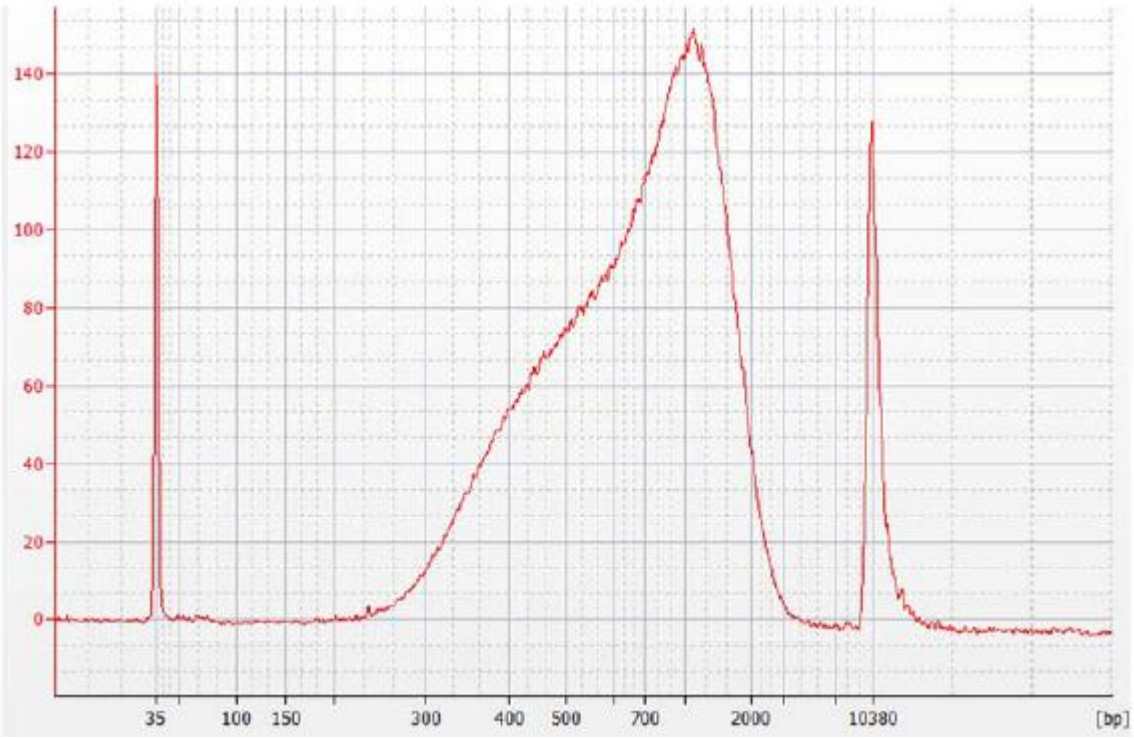

図 1 High Sensitivity DNA キットを用いた増幅後の gDNA ライブラリの泳動結果

Stopping Point

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4℃で一晩保存できます。それ以上置く場合は、-20 ℃で保管することができます。

STEP6. 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

シーケンサの 1 レーンでプールして解析するインデックス付加したライブラリの数は、使用するシーケンサ装置の出力スペックと、各研究で必要となる目的の Sequencing データ量によって決定します。シーケンサのスペックと、1 サンプルあたり必要になる Sequencing データ量を元に、1 レーンでプールするインデックス付加ライブラリの数を計算して下さい。

最適なクラスタ密度はお使いのイルミナ社シーケンサの機種や Version によって異なりますので、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ください。本プロトコルに記された DNA の最終的な濃度は、イルミナ社のアップデートにより変わることがありますので、事前にご確認ください。

SureSelect QXT dual index を用いて Multiplexing を実施する場合の index の最適な組み合わせのガイドラインは表 18 と表 19 をご参照下さい。

1. プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、インデックス付加サンプルをプールするための量を計算します。

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

V(f) ： プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f) ： プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例：イルミナ標準プロトコルでは 10 nM

： プールするインデックス付加サンプルの数

C(i) ： 各インデックス付加サンプルの初期濃度

表 8 に 4 つのインデックスタグ（それぞれ異なる初期濃度）の計算例を示します。最終的な容量（この例では 20uL、10nM の濃度)にするには Low TE を用います。

表 8　トータル量 20uL にするためのインデックスタグ付きサンプルの混合例

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

2. 最終的に必要な液量になるように調製を行います。
   - プールしたインデックス付加サンプル量の総量が最終的に必要な液量より少ない場合、Low TE Buffer を用いて総量が最終的に必要な液量になるように調整します。
   - プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して最終的に必要な液量とします。

3. 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween20 を 0.1%(v/v)の濃度になるように加えて-20℃で短期間保存できます。

STEP7. クラスタ増幅のためのサンプル調製

SureSelect QXT キットで調製した全ゲノムライブラリの最適な Seeding 濃度は、14 pM から 20 pM の間で、必要なデータ量とデータの質に応じて決定して下さい。Seeding 濃度とクラスタ密度は、ライブラリの DNA 断片サイズ分布によっても調整する必要がある場合があります。Sequencing 結果の QC のために、イルミナ社の推奨に沿って PhiX コントロールを添加して下さい。

適切なイルミナ社の Paired-End Cluster Generation キットをを用いてクラスタ増幅に進んでください。それぞれ必要な長さのペアエンドの Read (Read 1 と Read 2)と SureSelect QXT の 8 bp dual index の Read に使用可能な試薬キットの構成は表 9 をご覧下さい。クラスタ増幅のステップは、次ページ**「SureSelect QXT Read Primer のイルミナ Paired-End Cluster Generation キットと組み合わせての使用」**に記載の変更点を適用し、且つイルミナ社のマニュアルを参照して下さい。

表 9 イルミナ Cluster Generation キット 選択ガイド

Platform	Run Type	Read Length*	SBS Kit Configuration	Chemistry
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v3
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	4 x 50 Cycle Kit†	v3
HiSeq 2500	High Output	2 × 125 bp	250 Cycle Kit	v4
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4 x 50 Cycle Kit†	v3
MiSeq	All Runs	2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2
MiSeq	All Runs	2 × 300 bp	600 Cycle Kit	v3

* 目的によって上記以外の Read 長が必要な場合、Read 1 と Read 2 に加えて各 8 bp の dual index read (計 16 bp)に十分な量の Sequencing 試薬があることを確認して下さい。

† 200 cycle キット 1 つではこのフォーマットで Read 1 と Read 2 に加えて各 8 bp の dual index read (計 16 bp)を実施するのに十分な量の Sequencing 試薬が含まれません。200 cycle キットに加えて 50 cycle キット 1 つを組み合わせることも出来ます。

SureSelect QXT Read Primer のイルミナ Paired-End Cluster Generation キットと組み合わせての使用

HiSeq もしくは MiSeq プラットフォームで SureSelect QXT ライブラリをシーケンスするには、SureSelect QXT Library Prep Kit Box 2 に含まれる以下の Custom Sequenicng Primer を使用する必要があります。

- SureSelect QXT Read Primer 1
- SureSelect QXT Read Primer 2
- SureSelect QXT Index Read Primer

SureSelect QXT custom sequencing perimer は 100 μM の濃度に調整されており、以下に示す手順に沿って、適切なイルミナ Primer Solution で 1:200 に希釈をする必要があります。

1. HiSeq プラットフォームでは表 10 もしくは表 11 に示す通りプライマーを組み合わせて下さい。

NOTE

各プライマーを示された通りの比率で、正確に組み合わせることが重要です。混合液を調製する際は各試薬チューブのラベルに記載されたボリュームをそのまま採用せず、各溶液を正確に測り取ってご使用下さい。
それぞれの混合液をボルテックスで激しく混合し、custom read primer でインデックス検出が正しく行われるよう、溶液を完全に均一にして下さい。

表 10 HiSeq 2000 と HiSeq 2500 High Output モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	5 µL SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	995 µL HP6 or HP10	1 mL *
Index	15 µL SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	2985 µL HP8 or HP12	3 mL *
Read 2	15 µL SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	2985 µL HP7 or HP11	3 mL *

*イルミナの Cluster Generation Protocol の記載に従って、これらの混合液は HP6 もしくは HP10、HP8 もしくは HP12、HP7 もしくは HP11 として使用して下さい。

表 11 HiSeq 2500 Rapidt モードの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	8.8 µL SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	1741.2 µL HP10	1.75 mL *
Index	8.8 µL SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	1741.2 µL HP12	1.75 mL *
Read 2	8.8 µL SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	1741.2 µL HP11	1.75 mL *

*イルミナの Cluster Generation Protocol の記載に従って、これらの混合液は HP10、HP12、HP11 として使用して下さい。

2. MiSeq プラットフォームでは表 12 を参照し、以下の手順でプライマーを組み合わせて下さい。

表 12 MiSeq プラットフォームの Custom sequencing primer の調製

Sequencing Read	Volume of SureSelect^{QXT} Primer	Volume of Illumina TruSeq Primer	Total Volume
Read 1	3 µL SureSelect QXT Read Primer 1 (brown cap)	597 µL HP10	0.6 mL
Index	3 µL SureSelect QXT Index Read Primer (clear cap)	597 µL HP12	0.6 mL
Read 2	3 µL SureSelect QXT Read Primer 2 (black cap)	597 µL HP11	0.6 mL

a. イルミナの MiSeq 試薬カートリッジの#12, #13, #14, #18, #19, #20 のウェルに新しい 1000 uL 用ピペットチップで穴をあけます。
b. 3 本の新しい 1.5 mL チューブを出し、「Read 1」「Read 2」「Index」と蓋に記入します。
c. #12 のウェルから 600 uL の HP10 をピペッタで正確に測り取り、「Read 1」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 uL を除き、代わりに 3 uL の SureSelect QXT Read Primer 1 を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンダウンします。
d. #13 のウェルから 600 uL の HP12 をピペッタで正確に測り取り、「Index」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 uL を除き、代わりに 3 uL の SureSelect QXT index Read Primer を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンダウンします。

e. #14 のウェルから 600 uL の HP11 をピペッタで正確に測り取り、「Read 2」と記入した 1.5 mL チューブに移します。その後そこから 3 uL を除き、代わりに 3 uL の SureSelect QXT Read Primer 2 を加え、ボルテックスミキサでよく混合し、スピンダウンします。

f. SureSelect QXT Primer を混合した後の 600 uL の各溶液を、MiSeq 試薬カートリッジの以下のウェルに移します。

- 「Read 1」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、SureSelect QXT Read Primer 1 を含む Custom Primer Read 1 を#18 へ移す
- 「Index」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、SureSelect QXT index Read Primer を含む Custom index Primer を#19 へ移す
- 「Read 2」と記入した 1.5 mL チューブに入っている、SureSelect QXT Read Primer 2 を含む Custom Primer Read 2 を#20 へ移す

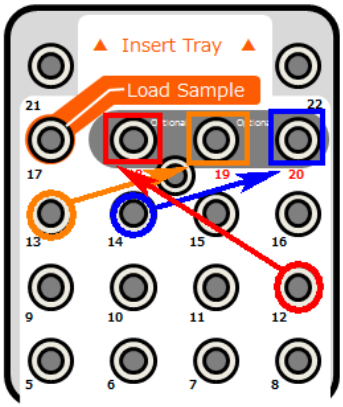

図 8 MiSeq 試薬カートリッジ。各色の丸は溶液を抜き取るウェルを、四角は Custom Sequenicng Primer を加えた後に溶液を移すウェルを示します。

g. これ以降の Sample のロードについては、MiSeq の取り扱い説明書をご覧下さい。

STEP7. Sequencing Run のセットアップと Read からのアダプタートリミング

Custome sequencing primer を使用した Sequencing Run のセットアップには、以下の追加ガイドラインと共にイルミナ社の実験プロトコルを参照して下さい。

SureSelect QXTdual index の配列情報は表 16 と表 17 を参照して下さい。

Read を Reference Genome にアラインメントする前に、SureSelect QXT アダプター配列を Read から除去する必要があります。以下のプラットフォームごとのガイドラインを参照して下さい。

- **MiSeq プラットフォーム Sequencing run setup とアダプタートリミングガイドライン**

Illumina Experiment Manager(IEM)ソフトウェアを用いて、**custom primer Sample Sheet** を作成して下さい。
IEM Sample Sheet Wizard を用いて、アダプタートリミングを含む Run の設定を行って下さい。Wizard で画面に指示が出た際に、**Use Adaptor Trimming** オプションを選択し、アダプター配列として **CTGTCTCTTGATCACA** と指定して下さい。これで MiSeq Reporter ソフトウェアがアダプター配列を認識し、Read からアダプタートリミングを実施します。

- **HiSeq プラットフォーム Sequencing run setup とアダプタートリミングガイドライン**

Dual Index 設定を用いて Sequencing Run の設定を行って下さい。QXT Custom Primer は標準的なイルミナの Sequencing primer のチューブに添加されているため、Run の中で Custom Primer を使用するために更なる特別な設定は不要です。
Sequencing Run の完了後、CASAVA を用いて demultiplex された FASTQ データを出力し、Agilent's Read Trimmer ツールを用いて Read からアダプター配列トリミングを実施して下さい。このツールは FASTQ 形式のデータを取り込んで Sequencing Read の端からアダプター配列を除去し、トリミング後の FASTQ ファイルを出力します。無償の Read Trimmer ツールとその説明は、以下からダウンロードできます。
http://download.chem.agilent.com/software/ngs_readtrimmer

3. リファレンス

この章では、キットの構成品、下流のサンプル Sequencing ステップで利用する情報などのリファレンス情報について説明します。

試薬一覧

SureSelect^{QXT} 試薬キットは、以下の構成品から成ります。各 Box は必ず指定温度で保管してください。

表 13　SureSelect^{QXT} Library Prep キット　構成品一覧

Component Kits	Storage Condition	16 Samples	96 Samples
SureSelect QXT Library Prep Kit, ILM, Box 1	Room Temperature	5500-0119	5500-0119
SureSelect QXT Library Prep Kit, ILM, Box 2	–20°C	5500-0120	5500-0121

表 13 の各構成品の内容は以下の表に記載されています。

表 14　SureSelect QXT Library Prep ILM, Box 1 の内容

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect QXT Stop Solution	bottle	bottle

表 15　SureSelect QXT Library Prep ILM, Box 2 の内容

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect QXT Buffer	tube with white cap	bottle
SureSelect QXT Enzyme Mix ILM	tube with orange cap	tube with orange 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
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	tube with green cap	tube with green cap
DMSO	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect QXT Read Primer 1	tube with amber cap	tube with amber cap
SureSelect QXT Read Primer 2	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect QXT Index Read Primer	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect QXT P7 dual indexing primers	P7 i1 through P7 i8 provided in 8 tubes with yellow caps (one tube per primer)	P7 i1 through P7 i12 provided in 12 tubes with yellow caps (one tube per primer)
SureSelect QXT P5 dual indexing primers	P5 i13 and P5 i14 provided in 2 tubes with blue caps (one tube per primer)	P5 i13 through P5 i20 provided in 8 tubes with blue caps (one tube per primer)

SureSelect QXT Dual Index の塩基配列

SureSelect^{QXT} インデックスの塩基配列を次の表に示します。各インデックスは 8 ベースの長さです。8 ベースのインデックスを用いてライブラリの Sequencing を行う方法についてはイルミナの取り扱い説明に従ってください。

表 16 SureSelect^{QXT} P7 index 1 から 12

Index Number	Sequence
P7 Index 1 (P7 i1)	TAAGGCGA
P7 Index 2 (P7 i2)	CGTACTAG
P7 Index 3 (P7 i3)	AGGCAGAA
P7 Index 4 (P7 i4)	TCCTGAGC
P7 Index 5 (P7 i5)	GTAGAGGA
P7 Index 6 (P7 i6)	TAGGCATG
P7 Index 7 (P7 i7)	CTCTCTAC
P7 Index 8 (P7 i8)	CAGAGAGG
P7 Index 9 (P7 i9)	GCTACGCT
P7 Index 10 (P7 i10)	CGAGGCTG
P7 Index 11 (P7 i11)	AAGAGGCA
P7 Index 12 (P7 i12)	GGACTCCT

表 17 SureSelect^{QXT} P5 index 13 から 20

Index Number	Sequence
P5 Index 13 (P5 i13)	TAGATCGC
P5 Index 14 (P5 i14)	CTCTCTAT
P5 Index 15 (P5 i15)	TATCCTCT
P5 Index 16 (P5 i16)	AGAGTAGA
P5 Index 17 (P5 i17)	GTAAGGAG
P5 Index 18 (P5 i18)	ACTGCATA
P5 Index 19 (P5 i19)	AAGGAGTA
P5 Index 20 (P5 i20)	CTAAGCCT

Dual Index 付加サンプルの Multiplexing に関するガイドライン

Dual Index を付加したサンプルのプールに関するガイドラインとして、16 反応キットは表 18 に、96 反応キットは表 19 にそれぞれ推奨するインデックスの組み合わせが記載されています。この推奨は、両端の Index Read の際に各サイクルでカラーバランスが保たれるように組み合わせが決定されています。Low-plexity の実験の際には Single index としても Dual Index としても Demultiplexing ができる柔軟性があります。Demultiplexing の際には 1 サンプルあたりに得られる Sequencing 量が最大になるように、1 bp のミスマッチを許容する設定を採用して下さい。

表 18　16 反応キットの Dual Index 付加サンプルのプールに関するガイドライン

Plexity of Sample Pool	Recommended SureSelect^{QXT} P7 Indexes	Recommended SureSelect^{QXT} P5 Indexes
1-plex	Any P7 index (i1 to i8)	Either P5 index (i13 or i14)
2-plex	P7 i1 and P7 i2 OR P7 i2 and P7 i4	P5 i13 and P5 i14
3-plex	P7 i1, P7 i2 and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4 and P7 i6 OR P7 i5, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
4- or 5-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i4 and any additional P7 index(es) OR P7 i3, P7 i4, P7 i6 and any additional P7 index(es) OR P7 i5, P7 i7, P7 i8 and any additional P7 index(es)	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
6- to 8-plex	Any combination of 6, 7, or 8 different P7 indexes	P5 i13 and P5 i14 (as needed)
9-to 16-plex	All eight P7 indexes (i1 to i8)	P5 i13 and P5 i14 (as needed)

表 19　96 反応キットの Dual Index 付加サンプルのプールに関するガイドライン

Plexity of Sample Pool	Recommended SureSelect^{QXT} P7 Indexes	Recommended SureSelect^{QXT} P5 Indexes
1-plex	Any P7 index i1 to i11	Any P5 index (i13 to i20)
2-plex	P7 i1 and P7 i2 OR P7 i2 and P7 i4	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18
3-plex	P7 i1, P7 i2 and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4 and P7 i6 OR P7 i5, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
4-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i3* and P7 i4 OR P7 i3, P7 i4, P7 i5* and P7 i6 OR P7 i5, P7 i6*, P7 i7 and P7 i8	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
5-plex	P7 i1, P7 i2, P7 i3*, P7 i4 and P7 i5* OR P7 i3, P7 i4, P7 i5*, P7 i6 and p7 i7* OR P7 i5, P7 i6*, P7 i7, P7 i8 and p7 i9*	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
6- to 11-plex	Any combination of P7 indexes i1 to i11 using each index only once	P5 i13 and P5 i14 OR P5 i15 and P5 i16 OR P5 i17 and P5 i18 (as needed)
12-to 88-plex	Any combination of P7 indexes i1 to i11 (as needed)	P5 i13 and P5 i14 and any third P5 index OR P5 i15 and P5 i16 and any third P5 index OR P5 i17 and P5 i18 and any third P5 index (as needed)
89-to 96-plex	All twelve P7 indexes (i1 to i12)	Any P5 indexes (i13 to i20, as needed)

* このマークで示されたインデックスは、プールされるほかのサンプルと異なるインデックス配列を持つものであれば、P7 i1 から P7 i11 の中の他のインデックスで置き換えることも可能です。

Copyright Agilent Technologies 2014

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版権は全て 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。
ユーザー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写、転載したり、他の言語に翻訳したりすることは法律で禁止されています。複写、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。