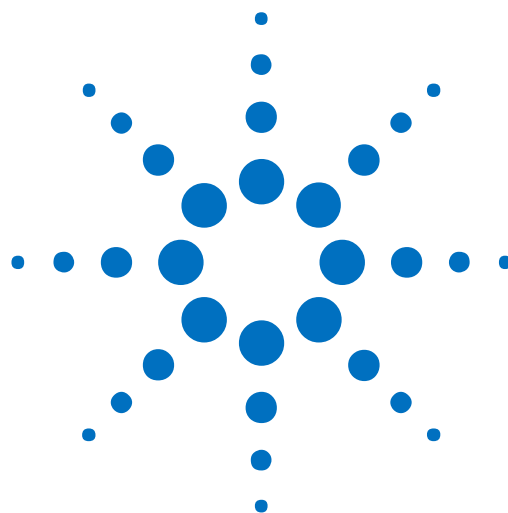




アジレント SureSelect
Strand-Specific RNA ライブラリ調製
自動化システム対応
イルミナマルチプレックスシーケンス対応
mRNA ライブラリ調製プロトコル

和文プロトコル

Version 1.4.JP 対応（英文 C.0 対応）

[2014 年 12 月版 和文]



SureSelect RNA
for Illumina sequencers

version 1.4.JP

フォームを立ち上げた際、左上に表示される
バージョンが **version 1.4.JP** であることを
ご確認ください。

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弊社までお問い合わせください。

本日本語プロトコルは、英語版の

Protocol

SureSelect Automated Strand-Specific RNA Library Prep

mRNA Library Prep for Illumina Paired-End

Multiplexed Sequencing Version C.0, December 2014

G9691-90030

に対応していますが、一部、日本での室温や環境にあわせて改変しています。

このガイドは、アジレント SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製システムを用い、イルミナ社マルチプレックスペアエンドシーケンス用 cDNA ライブラリを調製するために最適化されたプロトコルを記載しています。このプロトコルは、Total RNA サンプルから mRNA (whole-transcriptome) シーケンス用のライブラリを調製するために開発・最適化されています。調製したライブラリの中でターゲットとする転写産物由来 cDNA をキャプチャしてシーケンシングを行う場合は G9691-90020 に対応する和文プロトコルをご覧ください。

サンプル調製ステップはアジレント NGS 自動化システムで多くの部分が自動化されています。

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. SureSelect RNA ライブラリ調製のための Agilent NGS 自動化システムの使用

この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、SureSelect mRNA ライブラリ調製プロトコルの概要、および SureSelect 実験を計画する際の Agilent NGS 自動化システムを使った自動化プロセスで注意すべきポイントについて説明しています。

3. サンプル調製

この章では、Total RNA から cDNA シーケンシング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。

4. リファレンス

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

和訳 2014 年 10 月版 (Version 1.3.JP) での変更点

- LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.1 が LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.3.JP に変更されました。
- 2014 年 10 月に SureSelect Strand Specific RNA Library Prep BOX1 (-20°C 保管) のコンポーネントが改訂されました。

2014 年 10 月以前に出荷した BOX1 の

- RNA Seq Second Strand + End Repair Master Mix チューブ

は 2014 年 10 月の改訂以降、下記の 2 本に分かれています。

- RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix
- RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix

プロトコルバージョン 1.3.JP は新しい BOX1 に対応しております。

- AMPure XP ビーズを用いた第一鎖 cDNA の精製の溶出量に変更になりました。
- Low TE バッファのサプライヤ情報を更新しました。
- Sequence Analysis Guideline を追加しました。

和訳 2014 年 10 月 27 日版 (Version 1.3.JP) での変更点

- p52 70%エタノール量を変更しました。

和訳 2014 年 11 月版 (Version 1.4.JP) での変更点

- LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.3.JP が LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP に変更されました。これに伴い、illumina Sequencing のための cDNA ライブラリ調製の手順を変更しました。

和訳 2014 年 12 月版 (Version 1.4.JP) (英文 Version C.0) での変更点

- インデックスプライマーの並び順を変更した新しいキットのリリース(2014 年 12 月)に伴い、新しい構成のキット、旧来の構成のキットの 2 種類に対応したプロトコルになりました。

インデックスプライマーが青色プレート(96 反応キット 5500-0135)に入っている場合(2014 年 12 月以降に納品された該当の部品番号を含む)キットには、A01 から H12 の 8 bp index が含まれています。サンプルに Index をアサインする際は、巻末リファレンス記載の **新 8 bp** インデックスプライマー配置および配列情報を参照してください。

インデックスプライマーが透明なプレート(96 反応キット 5500-0117)に入っている場合(2014 年 12 月以前に納品された該当の部品番号を含む)キットには 1 から 96 の 8 bp index が含まれています。サンプルに Index をアサインする際は、巻末リファレンス記載の **旧来の 8 bp** インデックスプライマー配置および配列情報を参照してください。

- p52 70%エタノール量を変更しました。

- 結露による影響を避けるため、マスターミックスプレートはセットするたびに新しいものを使う指示に変更しました。

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.....	11
2. Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect RNA ライブラリ調製	13
Agilent NGS 自動化システムについて	14
Agilent NGS 自動化システム.....	14
Bravo プラットフォームについて.....	14
BenchCel について	15
VWorks Automation Control ソフトウェア	20
VWorks の終了.....	26
SureSelect RNA ライブラリ調製の概要	27
自動化ランを行う上での自動化条件の検討	29
自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる RNA サンプルの場所について.....	29
装置の設置について	30
PCR プレートの種類について	31
3. サンプルの調製	32
STEP1. Poly(A)RNA 精製/ RNA の断片化/ 第一鎖 cDNA の合成.....	33
STEP2. AMPure XP ビーズを用いた第一鎖 cDNA の精製.....	49
STEP3. Illumina Sequencing のための cDNA ライブラリ調製	53
STEP4. アダプタ付き cDNA ライブラリのインデックス付加と増幅.....	60
STEP5. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製.....	68
STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによる Adaptor-dimer の除去.....	72
STEP7. DNA サンプルのサイズチェックと定量	75
Option 1: Agilent 2100 バイオアナライザによる品質チェック	75
Option 2: Agilent 2200 TapeStation による品質チェック	77
STEP8. 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	79
STEP9. シーケンスサンプルの準備	81
4. リファレンス.....	83
試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット	
(青色ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)	84
試薬一覧 旧来の 8 bp のインデックスが入った試薬キット	
(透明ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)	88
自動化プロトコルで使用するプラスチックプレート類の数	94

1. はじめに

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

本プロトコルは Agilent の NGS 自動化システムを用いたサンプル自動調製について説明します。Agilent の SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットを用いて、自動化システムを用いずに手作業でサンプルを調製する場合には別途、専用プロトコル (G9691-90010 の和訳版) を参照ください。

NOTE

Agilent の SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットを、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 SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットをにつくましては、他のマニュアル操作の製品と同様に、誤った使用法による実験の失敗については、補償の対象外となりますことをご了承ください。万一、自動化システムもしくは弊社試薬の不具合により、実験がうまくいかなかった場合は、弊社サポート担当にご連絡ください。連絡先はプロトコル末尾に記載されています。

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。

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、自動化システムを操作ください。



操作に関する注意

<<重要>>

- ・ 遠心の際にシールを貼ったプレートについては、特にシールを貼ったままという記載のない限り、Bravo やミニハブのデッキにプレート进行載せる際に、シールを必ずはがしてください。シールをはがす時に、反動で液がはねないようにご注意ください。
- ・ このプロトコルの特定の段階では、Bravo デッキとサーマルサイクラの間で、実験者がサンプルプレートを素早く移動させる必要があります。ご使用になるサーマルサイクラを Agilent NGS 自動化システムのごく近くに置き、迅速かつ効率的なプレートの移動ができるようにしてください。
- ・ 最善の結果のためには、Agilent の SureCycler 8800 サーマルサイクラと専用の消耗品の使用を推奨します。その他のサーマルサイクラとの組み合わせでも実験可能ですが、多検体の実験の前に、その組み合わせでの結果を確認して下さい。本システムでサポートされている PCR プレートの種類については表 6 を参照し、この何れかが使えるサーマルサイクラをご使用下さい。
- ・ 各自動化プロトコルのランを始める前に、そのステップに詳述されているように Agilent NGS 自動化システムを準備してください。ワークステーションの Labware MiniHub にプレートをセットする際には、いつも p.37 の図 4 の向き (A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる) でプレートを置いてください。
- ・ Thermo Scientific Reservoir を MiniHub にセットする際は、かならず、切り欠きの部分が MiniHub の中心側を向くように置いてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けないようにしてください。
- ・ 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してください。
- ・ 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- ・ mRNA および cDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けるようにしてください。本プロトコルに示されている stopping point では、サンプルを -20°C で保存できます。ただし、サンプルの凍結融解の繰り返しは避けてください。
- ・ 凍結しているストック溶液を使用する際には次のステップで行います。
 1. 室温以上の温度で加熱しないように、かつできるだけ速く分注された溶液を融かします。
 2. Vortex Mixer で軽く短時間混ぜ、遠心機で 5~10 秒遠心して、チューブの壁やふたについた液を落とします。
 3. 使用時までオンアイスまたは冷却ブロックの中で保存します。
 4. ライブラリ調製マスターミックスの凍結融解は 5 回までに留めて下さい。1 チューブから 5 回以上実験を行う予定であれば、凍結融解を避けるためにいくつかのチューブに分注して下さい。
- ・ Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

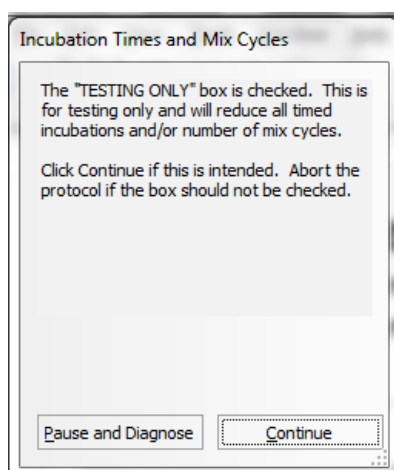
1. はじめに

- ・ アジレントサービス担当者向けの機能として、据え付け時のソフトウェアの動作確認のため、インキュベーションとミックスの時間をスキップして、プログラムを走らせる機能が付加されています。Form 画面の一番右下に次の画面があります。

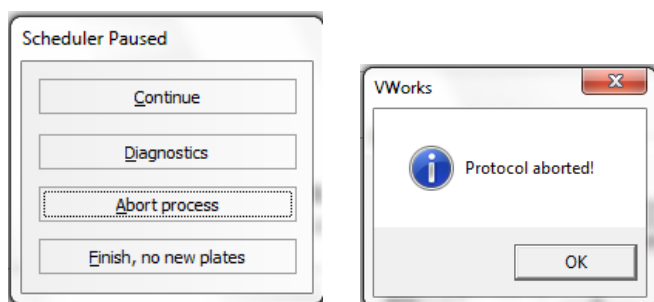


この設定に誤ってチェックを入れると、正常なインキュベーションとミックスが行われません。

誤ってチェックを入れたままプログラムをスタートすると、次のメッセージが画面に現れます。



このメッセージが画面に現れたら、プログラムが正常動作しませんので、Pause and Diagnosis のボタンをクリックしてください。続けて以下の Schedule Paused のポップアップ画面が出ますので、ここで Abort Process をクリックし、Protocol を Abort で止めてから、Advanced Setting の TESTING ONLY のチェックを外して、再度ランさせてください。



安全に関する注意

- ・ 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 WEB-site から pdf ファイルをダウンロードいただくことができます。

<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/ 96反応 あたり	内容量	備考
SureSelect 試薬キット						
SureSelect Strand Specific RNA Library 調製試薬, イルミナ対応, 96反応	Agilent	G9691B	指定	1	96反応分	マニュアル・自動化対応 ライブラリ調製試薬 96反応分
その他の試薬						
Actinomycin D	Sigma	A1410	相当	12 ug	2 mg	SureSelect Strand Specific RNAライブラリ調製試薬にはアクチノマイシンDが含まれませんので、別途ご用意下さい。固体の製品を購入し、DMSOで4ug/uLに溶解して使用します。調製後1ヶ月以内に使用して下さい。 1サンプルあたり60ng使用します。
DMSO (Dimethyl sulfoxide) Molecular Biology Grade	Sigma	D8418	相当	3 uL	50 mL	Actinomycin Dを溶解してストック溶液を調製するために使用します。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	33 mL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60 mL、A63882 450 mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当		100 mL	プールのライブラリをメスアップするのに使用します。
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約305 mL	500 mL	DEPC処理ではないこと。
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	約 50 mL	500 mL	98%以上、分子生物学用グレード、ほかの有機物質のコンタミネーションがないこと
※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。						
Agilent 2200 TapeStation消耗品						
D1000 ScreenTape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		
RNA ScreenTape	Agilent	5067-5576	推奨	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5577	推奨	1ラン		スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。
High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579	推奨	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
High Sensitivity RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5580	推奨	1ラン		スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	1ラン	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 RNA6000ナノキット	Agilent	5067-1511	推奨	1ラン	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。RNAのQCIにご利用できます。
Agilent RNA6000ピコキット	Agilent	5067-1513	推奨	1ラン	25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。RNAのQCIにご利用できます。

※大容量または小容量タイプがあるものはご利用いただけます。

1. はじめに

※【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。

実験に必要な装置、消耗品類

下記の表は以下の WEB-site から pdf ファイルをダウンロードいただくことができます。

<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 実験に必要な装置、消耗品類

<必要な消耗品類>						
品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量/ 96反応 あたり	内容量	備考
Robotic Pipetting Tips (Sterile, Filtered, 250 uL)	Agilent	19477-022	指定	44	50	
PCR用96Well Plate (以下①～④から1種類選択)			指定	11		和文実験プロトコル表6 「サポートされているPCRプレートの情報」に記載 されている、本自動化実験用にサポートされてい るPCRプレートのうち、使用予定のサーマルサイ クラに対応するもの
①96 ABI PCR half-skirted plates (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates)	Life Technologies	N801-0560				
②96 Agilent semi-skirted PCR plate	Agilent	401334				
③96 Eppendorf Twin.tec half-skirted PCR plates	Eppendorf	951020303				
④96 Eppendorf Twin.tec PCR plates (full-skirted)	Eppendorf	951020401 or 951020619				
Eppendorf twin.tec full-skirted 96-well PCR plates	Eppendorf	951020401	指定	10	25	(0030 128.648)
Thermo Scientific Reservoirs	Thermo Scientific	1064156	指定	6	20	
Costar General Assay Plate 3344	Corning	3344	指定	7	50	本製品はSureSelect Target Enrichment 自動化プロトコルおよびHaloPlex自動化プロトコル では使用しないプレートです。 別途ご用意下さい。
Nunc DeepWell Plates, sterile, 1.3 mL well volume	Thermo Scientific	260251	指定	6	50	
Axygen 96 Deep Well Plate, 2.0 mL, Square Well (waste reservoirs)	Axygen	P-2ML-SQ-C	指定	4	25	E&K Scientific p/n EK-2440 でも可
MicroAmp 96-Well base(black adapter for MicroAmp plates)	Life Technologies	N801-0531	指定	3	10	

NucleoClean Decontamination Wipes	Millioire	3097S	相当			自動化システムの埃をとり、清掃 するときに、キムワイブに浸みこま せて使用します。
Nuclease Free 1.5 mL microfuge tubes	Ambion	AM12400	相当		500本	核酸の吸着が少なく、且つ Nuclease Freeであるもの
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			

1. はじめに

<必要な器機・器具類>

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量 /96反応 あたり	内容量	備考
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当			HotTopのOn/Offが使用できること
96 well plate module for SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8810A	相当			
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2938C	指定			RNA・DNAの定量とサイズ確認に 必要です。Expert Control Software B.02.02以降のversion であること
アイスバケツ						
タイマー						
ボルテックスミキサー						
96穴プレート用遠心機	KUBOTA	PlateSpin II	相当			1500 x gで96ウェルプレートのス ピンダウンが可能なもの
卓上遠心器	日本ミリポア	チビタンII	相当			
ピペット	Pipetman	P10,P20,P200, P1000	相当			
電気泳動にAgilent 2200 TapeStationを使用する際のオプション品となります。必要に応じてご利用ください。						
2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA また は G2965AA				DNAの定性または定量に使用す ることができます。
SureSelect対応のNGS自動化システムで本自動化実験を行うために追加で必要な部品・消耗品です。 HaloPlex自動化プロトコルに対応している場合は以下の部品は不要となります。						
Bravo 96-well PCR plate insert (Red)	Agilent	G5498B#013	指定	1		合計2個必要です

※自動化システムが使用する消耗品については、必ず指定の製品をご利用ください。指定の消耗品の使用
を前提として、1 mm 以下の精度でプロトコルが組まれています。指定以外の製品を利用すると実験がう
まくいなくなる危険性があります。

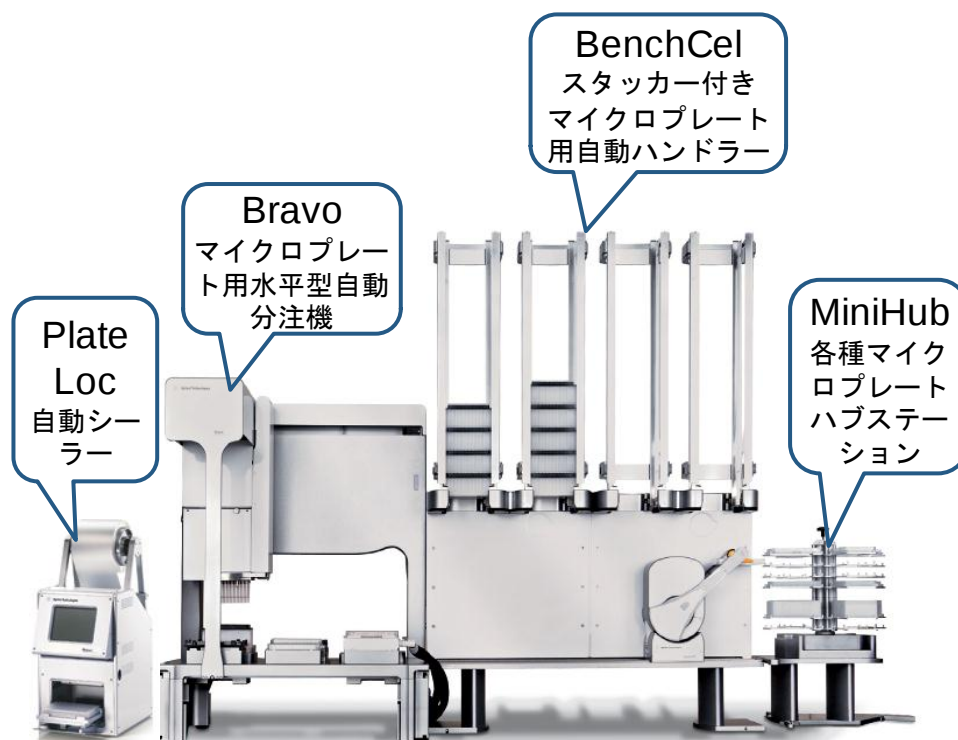
2. Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect RNA ライブラリ調製

この章では、Agilent NGS 自動化システムの紹介、SureSelect mRNA ライブラリ調製プロトコルの概要、および SureSelect 実験を計画する際の Agilent NGS 自動化システムを使った自動化プロセスで注意すべきポイントについて説明しています。

Agilent NGS 自動化システムについて

Agilent NGS 自動化システム

Agilent NGS 自動化システムは、多目的自動分注機の Bravo プラットフォーム、スタッカー付きマイクロプレート用自動ハンドラーの BenchCel、各種マイクロプレートハブステーションである MiniHub、自動シーラーの PlateLoc から構成されています。Bravo プラットフォームのデッキのオプションである Inheco ヒートブロック(4 番、6 番)とチラー(9 番)が Bravo に接続されています。さらに PlateLoc と BenchCel の動作に使用するエアコンプレッサー(または圧縮空気のライン)がシステムに接続されています。



Bravo プラットフォームについて

Bravo プラットフォームは、96 ウェル、384 ウェルのプレートのハンドリングに適した 9 つのプラットフォームデッキがある多目的自動分注機です。Bravo プラットフォームは VWorks Automation Control ソフトウェアでコントロールします。交換可能な 7 種類の固定チップまたは使い捨てチップ用ピペットヘッドが選択でき、0.1 μ L から 250 μ L までの液体を正確に分注できます。

CAUTION

はじめに、ご使用の Bravo プラットフォームの操作、メンテナンス、および安全上の注意をよくお読みください。Bravo Platform User Guide (G5409-90004) および VWorks Software User Guide (G5415-90002) を参照してください。

Bravoプラットフォームデッキ

このプロトコルの以下のセクションでは、Bravo デッキの指定の場所にプレートや試薬リザーバーを設置するための説明があります。Bravo プラットフォームデッキの番号については、図 1 を参照してください。正しく自動化システムを使用するために、このデッキの位置情報は非常に重要です。



図 1 Bravo プラットフォームデッキ

BenchCelについて

BenchCel のハンドラーが動作するスペースに、指定された以外のものを絶対に置かないように、また動作の邪魔になるものがないように、注意してください。BenchCel のスタッカーに戻されたチップボックスは、使用済みのものなので、ラン終了後、チップボックスを取り除き、中のチップを廃棄するようにしてください。

BenchCel の電源をオフすると、BenchCel のハンドラーは下方のホームポジションまで下がって止まります。指を挟まないように注意してください。

万一操作ミスなどで、BenchCel のハンドラーのアーム部分が曲がってしまった時には、専任のエンジニアによる位置調整が必要です。それ以上触らずに、本プロトコルの末尾に記載されているサポートお問い合わせ窓口にご連絡ください。

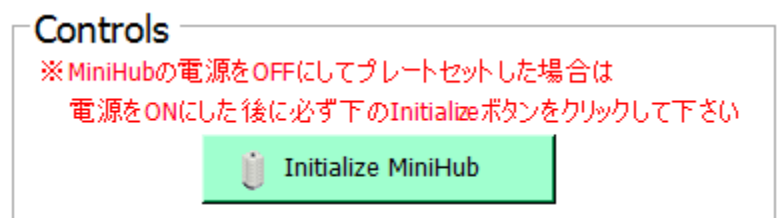
MiniHubについて

MiniHub にプレートを設定する際には、いつも p. 37 の図 4 の向き (A1 の位置が MiniHub に正対して手前左の位置になる) でプレートを置いてください。Thermo Scientific Reservoir を MiniHub にセットする際は、かならず、切り欠きの部分が MiniHub の中心側を向くように置いてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けないようにしてください。

MiniHub は最初に電源を入れた時には自由に動かすことができますが、一度初期化された後は、手で向きを変えることができません。無理に動かさないように注意してください。

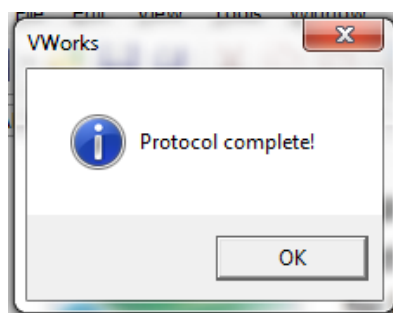
[MiniHub のイニシャライズボタン追加]

MiniHub の横や後ろにスペースがなく、MiniHub にプレートセットしにくい場合、MiniHub の電源をいったん OFF にして、手動で MiniHub を回転させて必要なプレートセットし、セットが終わった後に MiniHub の電源を再び ON にして、Initialize MiniHub ボタンを押してイニシャライズをかけることができるようになりました。



ただし、この機能は、上記の Initialize MiniHub のボタンがついた Form でのみ使用可能です。このボタンがついていない Form を使用している場合、MiniHub の電源を切って MiniHub を手で回転させないようにしてください。**MiniHub の電源を OFF にして位置を変えた場合、必ず、MiniHub のイニシャライズ操作が必要です。イニシャライズを行わずに動作を進めると、エラーが発生します。**

本ボタンをクリックして、MiniHub のイニシャライズを行うと、終了時に下記の画面が現れます。



OK ボタンを押してから、次の操作を行ってください。

MiniHub の棚の位置は高い精度でセットされています。もし万一無理な力を加えて、棚の位置が変わってしまった場合、専任のエンジニアによる位置調整が必要です。それ以上触らずに、本プロトコルの末尾に記載されているサポートお問い合わせ窓口にご連絡ください。

PlateLocについて

電源を入れて温度と空気圧が設定値に達するまではエラーの画面が出ます。温度と空気圧が設定値に達すると、画面の右側に RUN のボタンが出て、動作できるようになります。PlateLoc 用のシールは数種類ありますが、Agilent NGS 自動化システムでは、Clear Peelable Seal を使用しています。この Clear Peelable Seal でシールしたプレートは、数時間から1日までは 0 °C から -80 °C の低温で保存できますが、それ以上の期間の保存には適していません。1日より長く保存する場合、シールではなく、適切な Strip キャップなどをはめて密閉した状態で保管してください。

電源オン

エアコンプレッサー、Bravo、BenchCel、MiniHub、PlateLoc、Inheco ヒートブロックの電源を入れます。チラーはプロトコルを参照し、チラー電源をオンにすると指示されているプロトコルでのみ、電源を入れるようにします。エアコンプレッサーは電源を入れる前に、排気口をクローズの状態にしていることを確認してください。Bravo の電源は本体右側面に、BenchCel の電源は、本体右背面に、MiniHub の電源は、MiniHub が接続されている電源ボックスの正面にあります。Inheco ヒートブロックの電源は背面に、チラーの電源は左側面にあります。PlateLoc は背面の Air スイッチが ON であることを確認します。最後に PC の電源を入れ、VWorks ソフトウェアを起動します。

電源オフ

VWorks ソフトウェアをクローズします。メソッドは変更および上書き保存しないようにしてください。

その後、Bravo、BenchCel、MiniHub、PlateLoc、Inheco ヒートブロック、チラーの電源を落としていきます。BenchCel の電源を落とす時には、ハンドラーの下部に指を挟まないように注意してください。

エアコンプレッサーは電源を落とした後に、排気口を開けて、排気してください。その際、あまり勢いよく排気口を Open すると、高い圧力で空気と水が飛び出すことがあるので、ご注意ください。動作中に内部にたまった水も同時に排出されますので、排気口にキムタオルなどを置いて水が床に垂れないようにご注意ください。

PlateLoc は電源を単純にオフすると、プレートを載せるデッキが外に出た状態のままになります。デッキが出ている状態が気にならない場合は、そのままでもかまいませんが、プレートを内部にしまいたい場合は、エアコンプレッサーの電源をオフにした後、PlateLoc の背面の Air スイッチを OFF にしてください。デッキを手で、内部に押しこむことができます。次に使用するときには、PlateLoc の背面の Air スイッチを必ず ON にしてください。

Bravo デッキヒートブロックの温度設定

Bravo デッキ 4 番と 6 番には Inheco ヒートブロックが設置されており、ランの間に設定した温度でサンプルプレートをインキュベートするために使用しています。高温 (85°C) または低温 (4°C) でのインキュベーションステップを含むランでは、ランを実行する前に使用するヒートブロックの温度をあらかじめ、Inheco Multi Tech Control 装置本体の画面で設定しておくと、操作時間を短縮できます。

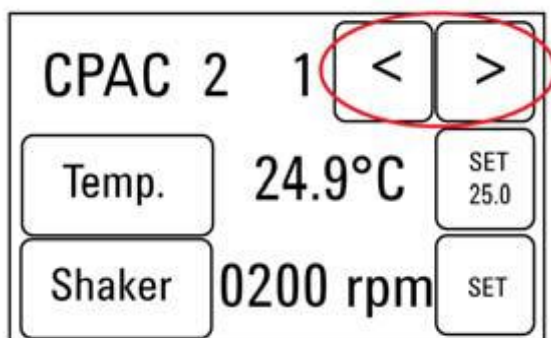
Bravo デッキヒートブロックの温度は、以下に説明する手順で、Inheco Multi TEC Control 装置で変更することができます。Bravo のヒートブロック付きデッキの番号は、Inheco Multi TEC Control 装置で表 3 のように示されます。

表 3 Inheco Multi TEC Control タッチスクリーン表示

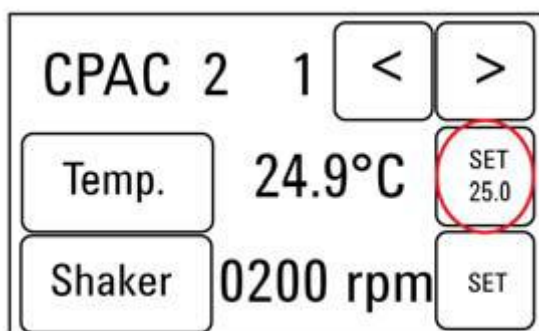
Bravo デッキの位置	Inheco Multi TEC Control Screen の表示
4	CPAC 2 1
6	CPAC 2 2

2. Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect RNA ライブラリ調製

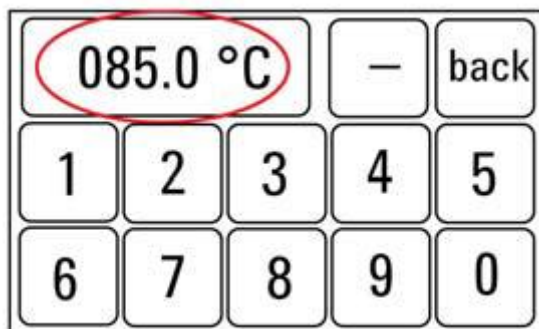
1. 矢印ボタンで適切なデッキ位置 (CPAC 2 1 または CPAC 2 2) を選択します。



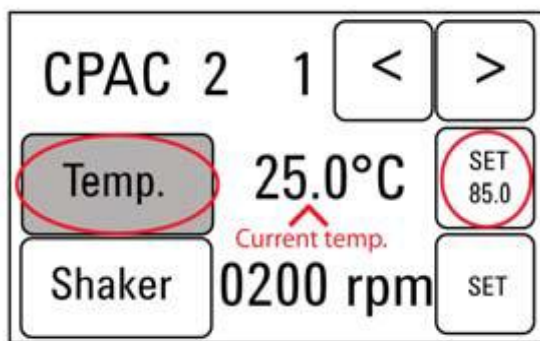
2. 選択したデッキ位置のヒートブロックの温度を設定するには、SET ボタンを押します。



3. テンキーパッドで目的とする温度を入力します。入力した温度は画面の左上に表示されます。正しい温度が表示されたら、その温度表示部分を押すと、その温度が入力されたことになります。(表示されただけでは入力したことにならないので、ご注意ください。)



4. Temp ボタンを押して、新しく設定した温度が SET ボタンに表示されることを確認してください。Temp ボタンを押すと、Temp ボタンの色が暗くなり、選択したヒートブロックが新しく設定した温度になるように加熱または冷却されます。このボタンを押さないと、実際に入力した温度にコントロールされないなので、ご注意ください。



チラーの温度設定

Bravo デッキの 9 番にはチラーが接続されており、必要に応じてデッキを冷却または加熱するようになっています。プロトコルにチラーの温度設定の指定がある場合のみ、チラーは ON にします。それ以外では電源を OFF にしておきます。

チラーの温度設定は、画面表示を見ながら Up もしくは Down ボタンで、表示温度が指定された温度になるようにして、ENTER ボタンでその温度を決定し、さらに START ボタンを押して、指定した温度で温度コントロールされるようにしてください。温度コントロールが実行されると、画面表示の左端の * マークが その時点の循環水の温度から上げる場合は+ (プラス) マークに、温度を下げる場合は - (マイナス) マークに変わります。



VWorks Automation Control ソフトウェア

VWorks ソフトウェアはお使いの Agilent NGS 自動化システムに含まれ、ロボットと周辺機器をパソコンで制御できます。Agilent NGS 自動化システムには、SureSelect システムに必要な自動分注プロトコルがすべて入った VWorks ソフトウェアがあらかじめインストールされています。VWorks ソフトウェアを使い始める際の一般的な取扱い方と含まれるプロトコルについて、以下に説明します。SureSelect の各ステップの操作で指定された VWorks プロトコルを使用する際に、その VWorks プロトコルで必要となる設定については、プロトコルの各ステップで説明します。

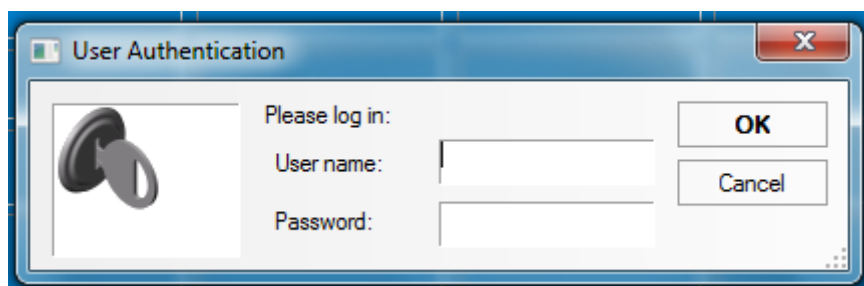
NOTE

このマニュアルは、VWorks software version 11.3.0.1195 に対応しています。

VWorks のバージョンについてのご質問は、email_japan@agilent.com までご連絡ください。

VWorksソフトウェアへのログイン

1. Windows のデスクトップにある VWorks アイコン、または SureSelect_RNA_ILM.VWForm ショートカットをダブルクリックして VWorks ソフトウェアを起動してください。
2. User Authentication ダイアログボックスが現れない場合には、VWorks ウィンドウのツールバーの **Log in** をクリックしてください。
3. User Authentication ダイアログボックスでは、VWorks ユーザー名とパスワードを入力し、**OK** をクリックしてください。(ユーザーアカウントがない場合には、管理者に問い合わせてください。)



VWorksソフトウェアでの User Authentication の設定 (Administrator権限ユーザーのみ可能)

1. VWorks ソフトウェアの画面で Full Screen を off にしてください。
2. 画面上部のメニューバーから Tools をクリックし、その下の User Management をクリックしてください。
3. Create New User を選択します。この画面で、適切な User Name と Password を設定してください。また適切な Security Level を設定ください。Administrator レベルおよび Technician レベルは、メソッドの書き換えが可能なので、Administrator 権限者以外の使用はお勧めしません。**通常はメソッドの書き換えができない Operator レベルでの設定を推奨します。**ただし、アクセスできる機能は制限されます。
4. Pass word の適切な有効期間など他の項目を設定し、VWorks の画面に戻ります。

Worksプロトコルとランセットファイル

VWorks ソフトウェアの自動化プログラム実行のためのファイルには、.pro(プロトコル)ファイルと.rst(ランセツ

ト)ファイルの 2 種類があります。ランセットファイルはワークステーションで複数の自動化プロトコルを組み合わせで一度に実行するために使用します。

SureSelect_RNA_ILM.VWForm を使用したランの設定と開始

VWorks を起動すると、下に示す SureSelect_RNA_ILM.VWForm が画面に現れます。この画面上で、各自動化プロトコルまたはランセットの設定および開始を行います。

SureSelect RNA for Illumina sequencers
version 1.4.JP

Parameters

- 1) Select Protocol to Run
mRNA_Furification_v1.0.pro
- 2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling
96 ABI PCR half skirt in Red Alum Insert
- 3) Select Number of Columns of Samples
1
- 4) Click button below to Display Initial Workstation Setup
- 5) Load labware according to Workstation Setup -->

Controls

※MiniHubの電源をOFFにしてプレートセットし場合は、電源をONとした後必ず下のInitializeボタンをクリックしてください

Once you have loaded labware according to Workstation Setup on right, click "Run Selected Protocol" to start run.

Elapsed Time: 00:00:00

Information

Currently Running Protocol:

Workstation Setup

MiniHub

	MiniHub Cassette 1	MiniHub Cassette 2	MiniHub Cassette 3	MiniHub Cassette 4
Shelf 5				
Shelf 4				
Shelf 3				
Shelf 2				
Shelf 1				

Bravo Deck

<Position 1>	<Position 2>	<Position 3>
<Pos 4: Peltier>	<Pos 5: Shaker>	<Pos 6: Peltier>
<Pos 7: Magnetic>	<Position 8>	<Pos 9: Chiller>

BenchCel

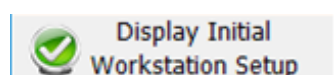
BenchCel Stacker 1	BenchCel Stacker 2	BenchCel Stacker 3	BenchCel Stacker 4

※BenchCel RobotをHomeポジションに戻す必要がある場合はBenchCel Robot Homeボタンをクリックしてください

Advanced Settings

☐ TESTING ONLY: Reduces all incubation times and/or mix cycles

1. デスクトップの SureSelect_RNA_ILM.VWForm ショートカットを使ってこのフォームを開きます。
2. フォームのドロップダウンメニューから、適切な SureSelect ワークフローステップとサンプルの列数を選択します。サンプルの列数は1つの列が 8 サンプルに対応しています。2 列は 16 サンプル、3 列は 24 サンプルとなり、最大 12 列となります。
3. このフォームですべてのランのパラメータを決定したら、**Display Initial Workstation Setup** をクリックします。



4. フォーム上の Workstation Setup の部分には、Bravo、BenchCel、MiniHub のそれぞれについて、決定したランパラメータに応じて必要となる試薬と実験器具をセットする場所が示されます。この指定場所を間違えると、自動化プロトコルは正常にランされませんので、必ずダブルチェックするようにしてください。

SureSelect RNA for Illumina sequencers
version 1.4.JP

Parameters

1) Select Protocol to Run
mRNA_Purification_v1.0.pro

AMPureXP Case: Not Applicable

2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling
96 ABI PCR half skirt in Red Alum Insert

3) Select Number of Columns of Samples
1

4) Click button below to Display Initial Workstation Setup
Display Initial Workstation Setup Clear Workstation Setup Display

5) Load labware according to Workstation Setup -->

Controls

※MiniHubの電源をOFFにしてプレートセットし場合は電源をONとした後に必ず下のInitializeボタンをクリックしてください

Initialize MiniHub

Once you have loaded labware according to Workstation Setup on right, click "Run Selected Protocol" to start run.

Run Selected Protocol Pause

Full Screen Gantt Chart Elapsed Time: 00:00:00

Reset All Form Selections to Defaults

Information

Currently Running Protocol:

Workstation Setup

MiniHub

	MiniHub Cassette 1	MiniHub Cassette 2	MiniHub Cassette 3	MiniHub Cassette 4
Shelf 5	Empty Corning 3344 Plate	Empty Corning 3344 Plate	Empty Corning 3344 Plate	
Shelf 4		Bead Binding Buffer in twin.tec		
Shelf 3		Bead Elution Buffer in twin.tec		
Shelf 2	Empty Tip Box		Bead Wash Buffer in Nunc DeepWell	
Shelf 1	New Tip Box			Empty Tip Box

Bravo Deck

<Position 1>	<Position 2>	<Position 3>
Waste Reservoir (Asygan 96DW)		
<Pos 4: Pellicer> RT Oligo dT beads (Set labware in 2)	<Pos 5: Shaker>	<Pos 6: Pellicer> RT Empty Plate (Set labware in 2)
<Pos 7: Magnetic> Total RNA in twin.tec Plate	<Position 8>	<Pos 9: Chiller> 0°C Nunc Master Mix Plate (Col 1-2) on Silver Insert

BenchCel

BenchCel Stacker 1	BenchCel Stacker 2	BenchCel Stacker 3	BenchCel Stacker 4
1 Tip Box	Empty	Empty	Empty

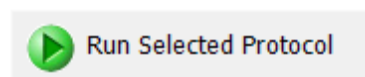
※BenchCel RobotのHomeポジションに必ず必要がある場合はBenchCel Robot Homeボタンをクリックしてください

BenchCel Robot Home

Advanced Settings

☐ TESTING ONLY: Reduces all incubation times and/or mix cycles

5. NGS 自動化システムが正しくセットアップされたことを確認したら、**Run Selected Protocol** をクリックしてください。

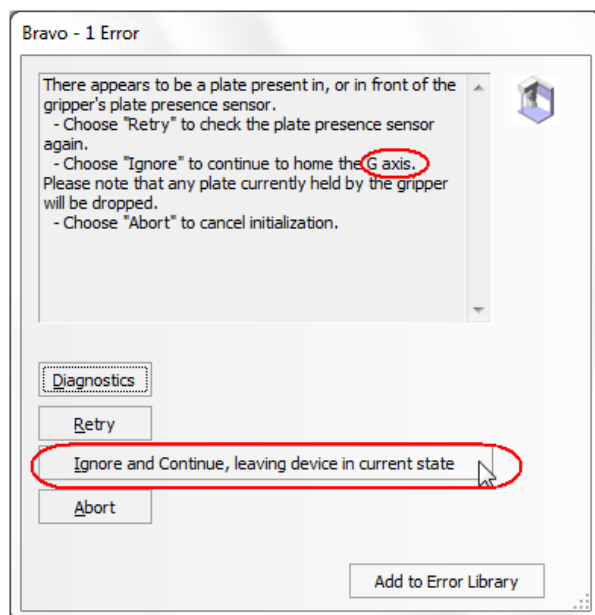


Bravoの初期化

Bravo の電源を入れて最初に VWorks をスタートしたときには、Bravo の初期化の動作に伴い、必ず画面に下記のエラーメッセージが2回出ます。必ず下記の指示に従って、操作ください。**この時点で選択を間違えると、初期化が正しく行われず、プロトコルをランしている途中でエラーで止まってしまいます。**正しい選択を行うようにご注意ください。

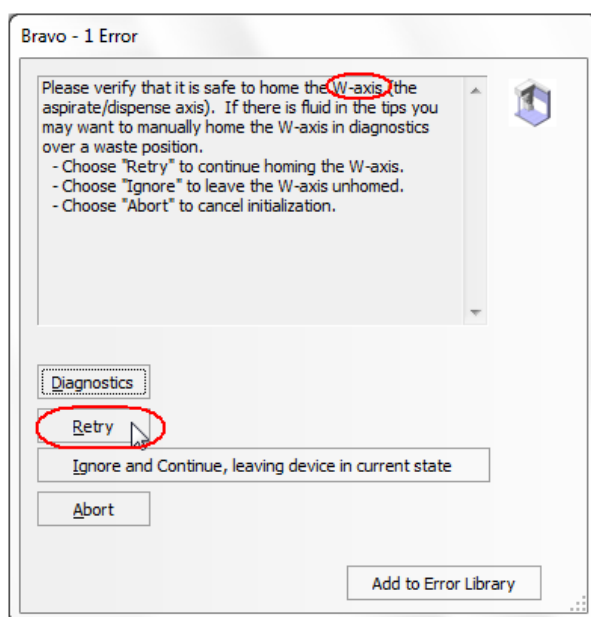
1. 最初はグリッパーの初期化に伴う G axis のエラー表示が出ます。

このエラー表示が出たら、常時 **Ignore and Continue, leaving device in current state** を選択してください。



2. 次に W-axis の初期化に伴うエラー表示が出ます。

このエラー表示が出たら、常時 **Retry** を選択してください。



シミュレーション設定の確認

VWorks ソフトウェアはシミュレーションモードで実行することもでき、その間はスクリーンで入力したコマンドは NGS 自動化システムでは実行されません。ランを開始してもワークステーションの装置が反応しない場合、以下の操作を行い、VWorks でのシミュレーションモードの状態を確認してください。

- ・ ステータスインジケータに **Simulation is off** と表示されていることを確認してください。(View > Control Toolbar とクリックするとステータスインジケータが表示されます。)



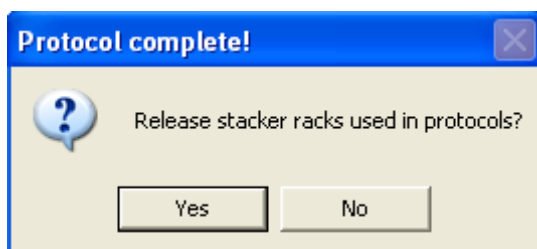
- ・ そのインジケータに **Simulation is on** と表示されていたら、ステータスインジケータのボタンを押してシミュレーションモードをオフにしてください。

NOTE

SureSelect_RNA_ILM.VWForm フォームにツールバーが見えない場合、**Full Screen on/off** をクリックしてフルスクリーンモードを終了してください。それでもツールバーが見えない場合には、フォーム上で右クリックし、メニューから **Control Toolbar** を選択してください。

プロトコルまたはランセットの終了

下のウィンドウはランが完了すると表示されます。Yes をクリックして BenchCel ラックを解放し、次の.pro または .rst でのランに備えるために使った試薬などを取り除いてください。ただしプロトコルによっては引き続き使用するプレートやラックもありますので、各ステップでの指示に従ってください。



VWorks の終了

Administrator もしくは Technician モードで VWorks を使用している場合は、VWorks を通常の操作で Close できますが、Operator モードで使用している場合、そのまま VWorks を close することができません。下記の手順で Close ください。

1. VWorks の Form の画面に出ている Full Screen on/off をクリックして、Full Screen off の状態にします。



2. 画面上部の Control Toll Bar から LogOut のアイコンをクリックします。



もし Control Tool Bar が画面に出ていない場合は、画面上部の View のメニューをクリックし、その中の Control Toll Bar を選択した状態にしてください。

3. Log out すると、このボタンが Log in に変わります。下記のユーザー名と password でログインしてください。
User Name : administrator
Pass Word : administrator
4. ログイン後ただちに、VWorks を Close してください。ここで万一プロトコルを変更してしまうと、上書きされてしまう怖れがあります。ログイン後は操作をせずに、ただちに Close してください。

SureSelect RNA ライブラリ調製の概要

イルミナ社のペアエンドシーケンスプラットフォームを用いてシーケンスするライブラリを調製するための SureSelect のワークフローを図 2 で説明します。シーケンスするサンプルは、まずそれぞれ、個別にライブラリ調製を行います。その後 PCR 増幅によってインデックス(バーコード)配列を各サンプルに付加します。必要なカバレッジとシーケンサーのキャパシティによっては、1 レーンあたり最大 48 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスが行えます。マルチプレックスシーケンスのための Index タグは、SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットに含まれます。

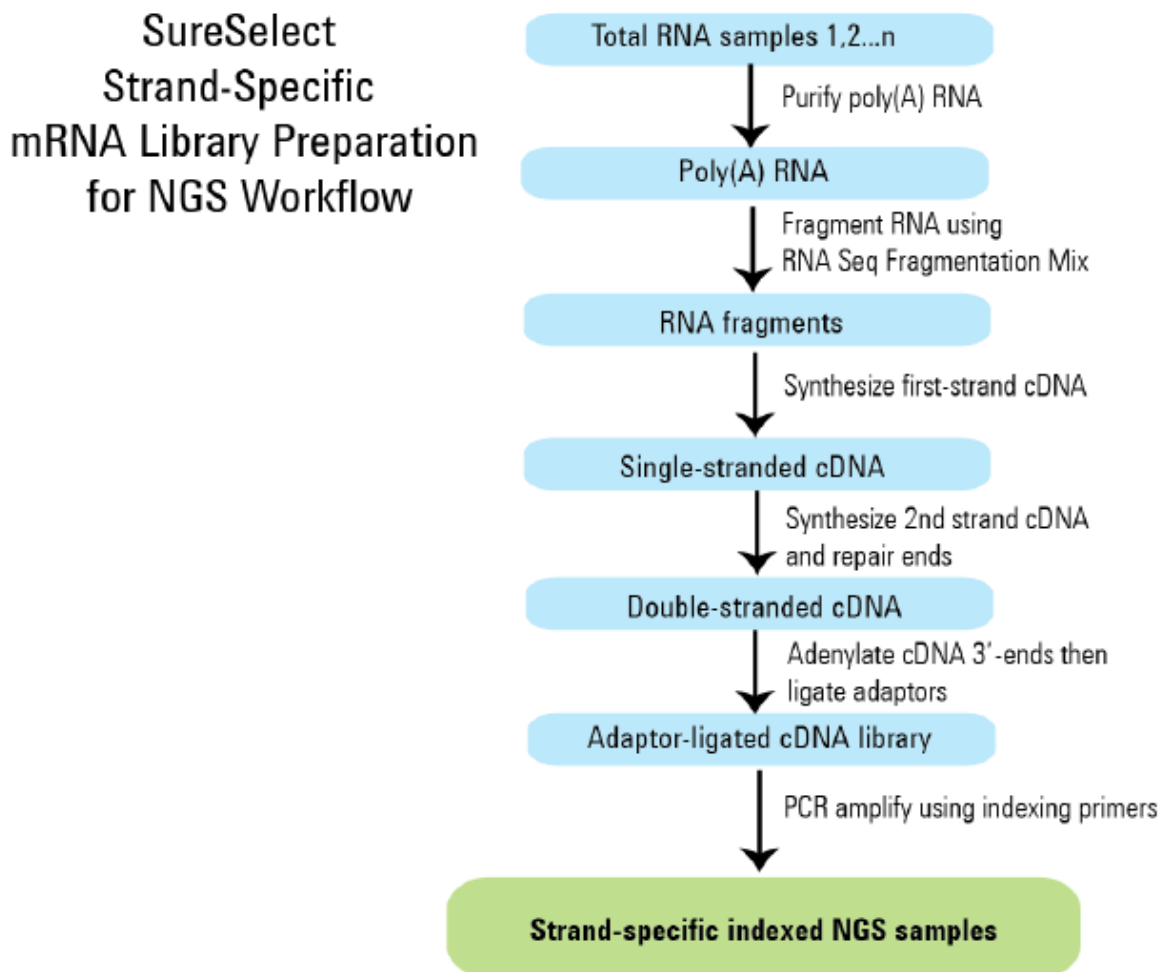


図 2 サンプル調製ワークフロー

2. Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect RNA ライブラリ調製

表 4には、SureSelect のワークフローの中で使われる VWorks のプロトコルがまとめてあります。サンプルを処理する際に使用される VWorks プロトコルの詳細な説明については、サンプル調製の章を参照してください。

表 4 ワークフローで使用される VWorks プロトコルおよびランセットの概要

Workflow Step	VWorks Protocols Used for Agilent NGS Workstation automation
- Purify poly(A) RNA using oligo(dT) beads - Chemically fragment the poly(A) RNA - Synthesize first-strand cDNA	mRNA_Purification_v1.0.pro
Purify first-strand cDNA using AMPure XP beads	AMPureXP_v1.1.pro:First Strand
- Synthesize second-strand cDNA - Repair DNA ends - Purify end-repaired DNA - Adenylate DNA 3'-ends - Ligate adaptors - Purify adaptor-ligated DNA	LibraryPrep_RNASeqILM_V1.4.JP.rst
Amplify adaptor-ligated cDNA library using indexing primers	TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro
Purify indexed library amplicons using AMPure XP beads	AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR
Remove adaptor-dimers using AMPure XP beads	AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers

自動化ランを行う上での自動化条件の検討

Agilent NGS 自動化システムを用いて、Illumina プラットフォームでシーケンスするために処理できる RNA サンプルの数は、1、2、3、4、6、または 12 カラム (8、16、24、32、48、または 96 ウェルに相当) から選択できます。ただし、本試薬は 24 検体単位で使用したときに過不足がないように調整されているので、24 より少ない検体数でランしたときには、試薬が 96 検体分には足りなくなります。できるだけ 24 検体単位で処理するように、実験計画を立ててください。

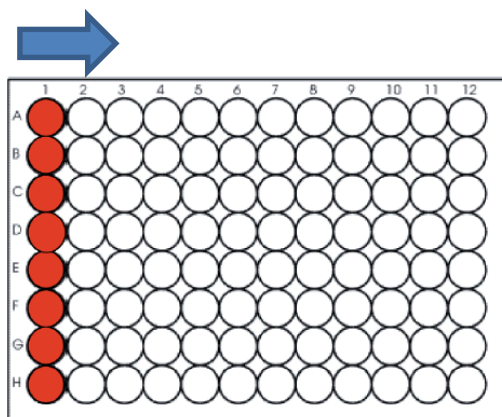
表 5 カラム数とサンプル数の対応表

カラム数	総サンプル数
1	8
2	16
3	24
4	32
6	48
12	96

各 96 反応分のキットは、1 ランあたり 3 カラム (24 検体分) の実験を 4 回行うために必要な試薬量を含んでいます。

自動化プロセスで 96 ウェルプレートに入れる RNA サンプルの場所について

- Agilent NGS 自動化システムは、サンプルの処理を常にカラム (Column、列) 単位で行い、カラム 1 がスタートポイントとなります。よって、RNA サンプルは 96 ウェルプレートにカラム単位でセットし、A1 から H1 へ、次に A2 から H2 へ、最後に A12 から H12 という順番でセットするようにします。12 カラムより少ないカラム数でランを行うときには、サンプルカラム間に間を空けず、つねに左のカラムから隙間のないように、サンプルをセットするようにします。



- cDNA ライブラリへのインデックスタグ付加のステップ (図 2) では、インデックスプライマーを別のプレートにセットする必要があります。実験デザインを立てる際に、適切な番号のインデックスプライマーを適切なウェル (サンプル) をそれぞれ割り当てるようにしてください。

CAUTION

このプロトコルは新しい構成のキットと旧来の構成のキットのインデックスプライマーについて記述しています。実験を始める前に必ず、ご使用のキットのバージョンをご確認下さい。

新 8 bp のインデックス(96 反応用)は、5500-0135 のボックス中の青色 96 ウェルプレート中に入っています。巻末リファレンス記載の **新 8bp** インデックスプライマー配置および配列情報をご参照下さい。

旧 8bp のインデックス(96 反応用)は、5500-0117 のボックス中の透明 96 ウェルプレート中に入っています。巻末リファレンス記載の **旧来の 8bp** インデックスプライマー配置および配列情報をご参照下さい。

装置の設置について

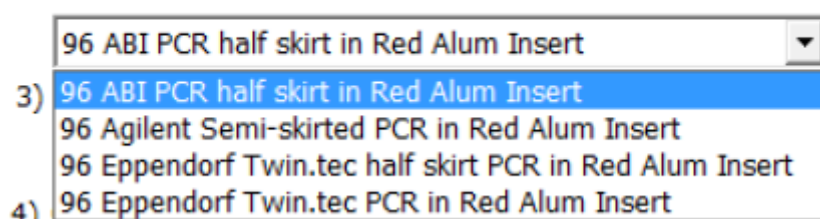
- ・ ワークフローの中では、Bravo デッキとサーマルサイクラとの間でサンプルプレートを頻繁に動かす必要があります。使用するサーマルサイクラを Agilent NGS 自動化システムのできるだけ近くに設置し、迅速で効率的なプレート移動ができるようにしてください。
- ・ ワークフローのステップの中には、サンプルプレートを PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーでシールした後、遠心してスピンドウンするステップがあります。効率をよくするために、遠心機を Agilent NGS 自動化システムの近くに設置するようにしてください。

PCRプレートの種類について

本自動化プロトコルの中では、サンプルをサーマルサイクラに移す前の準備として、PCR プレートに試薬やサンプルを分注するステップが複数あります。これらのステップでは、各プレートに応じた正しいリキッドハンドリング作業を行うために、SureSelect_RNA_ILM.VWForm 上で、使用する PCR プレートの種類を指定する必要があります。自動化プロトコルを開始する前に、使用予定の PCR プレートが、本システムでサポートされた、下記の何れかの PCR プレートであることを確認して下さい。下記の 4 種類以外の PCR プレートは使わないで下さい。

実験で使用する PCR プレートの種類は、以下のメニューで指定します。

2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling



サポートされている各 PCR プレートのベンダーと型番の情報は、表 6 に記載されています。これらの中から 1 つ、使用予定のサーマルサイクラで使用可能なプレートを選択して下さい。このプレートでインキュベーション及び PCR を行うため、使用予定のサーマルサイクラがこれらのいずれにも対応していないと実験することが出来ません。

表 6 サポートされている PCR プレートの情報

Description in VWorks menu	Vendor and part number
96 ABI PCR half-skirted plates (MicroAmp Optical plates)	Life Technologies p/n N8010560
96 Agilent semi-skirted PCR plate	Agilent p/n 401334
96 Eppendorf Twin.tec half-skirted PCR plates	Eppendorf p/n 951020303
96 Eppendorf Twin.tec PCR plates (full-skirted)	Eppendorf p/n 951020401 or 951020619

3. サンプルの調製

この章では、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ランするための RNA ライブラリを、Agilent NGS 自動化システムを用いて調製する方法を説明します。

マルチプレックスシーケンスを行うサンプルは、96 ウェルプレートのウェルの中で個別に、ライブラリ調製されます。その後 PCR 増幅によってインデックス(バーコード)配列を各サンプルに付加します。必要なカバレッジとシーケンサーのキャパシティによっては、1レーンあたり最大 48 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスが行えます。

他の情報に関しては、イルミナのプロトコル *Preparing Samples for Multiplexed Paired-End Sequencing* (p/n 1005361 Rev. C)、または適切なイルミナのプロトコルを参照してください。

STEP1. Poly(A)RNA 精製/ RNA の断片化/ 第一鎖 cDNA の合成

このステップでは、自動化プロトコル mRNA_Purification_v1.0.pro を使って、RNA ライブラリ調製のワークフローの複数のステップを実行します。まず、total RNA をオリゴ(dT)磁性ビーズに連続 2 ラウンドにわたって結合させることにより、Poly(A) RNA を精製します。その後、精製された Poly(A) RNA を RNA シーケンスライブラリ調製に適したサイズにするために、化学的に断片化し、第一鎖 cDNA に変換します。

本 mRNA ライブラリ調製自動化プロトコルでは、50 ng から 4 ug の total RNA サンプルから実験をスタートします。それぞれの total RNA サンプルは、自動化のランを開始する前に nuclease-free 水で 25 uL の容量に調整して下さい。

NOTE

本プロトコルは RNA Integrity Number (RIN) 8 以上の TotalRNA を用いてバリデーションされています。RIN が低いサンプルを用いると、オリゴ(dT)磁性ビーズで抽出される PolyA の量に影響を与えます。また、Total RNA に含まれる PolyA の量は、Total RNA を抽出したサンプルによって変わる可能性があり、50 ng 以上の Total RNA 量が必要な場合があります。

自動化プロトコルの本ステップ(STEP1.)では、NGS 自動化システムのオペレーターは、リキッドハンドリングを行う自動化システムと、インキュベーションに用いるサーマルサイクラーの間で、サンプルプレート移動させるために、自動化システムの傍に付いている必要があります。また、オペレーターは本自動化プロトコルの p.46 で使用する直前に、アクチノマイシン D の DMSO ストック溶液から 120 ng/uL アクチノマイシン D 希釈液を準備し、First Strand マスターミックスと 120 ng/uL アクチノマイシン D 希釈液の混合液を調製して分注する必要があります。

ワークステーションの準備

1. デスクトップ上の SureSelect_RNA_ILM.VWForm のアイコンをダブルクリックし、SureSelect セットアップフォームを立ち上げます。
2. VWorks ソフトウェアにログインします。
3. チラー(Thermo Cube)の電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
4. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。

3. サンプル調製

試薬の調製

5. 表 7 に示す試薬を室温に戻します。

表 7 Poly(A) RNA の精製と RNA の断片化に使用する試薬

試薬	保管場所	プロトコルで 使用される箇所
Oligo(dT) Microparticles	RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C 保存)	P. 35
RNA Seq Bead Washing Buffer	RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C 保存)	P. 35
RNA Seq Bead Elution Buffer	RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C 保存)	P. 35
RNA Seq Bead Binding Buffer	RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C 保存)	P. 35
RNA Seq Fragmentation Mix	RNA Library Prep Kit, Box1 (-20°C 保存)	P. 35

6. 固体のアクチノマイシン D を DMSO で溶解し、4 ug/uL アクチノマイシン D/ DMSO ストック溶液を調製します。本自動化プロトコルでは、p.46 で使用する直前に 120 ng/uL のアクチノマイシン D 希釈液を水で調製するために、この 4 ug/uL の DMSO ストック溶液を 3 uL 使用します。4 ug/uL DMSO ストック溶液は、3 uL 以上であれば、今後の使用頻度と秤量のし易さに応じて適当な量で作製し、ストックしておくことが出来ます。

調製例) 2.0 mg のアクチノマイシン D (固体、Sigma A1410) の入った試薬ビンに、DMSO 500 uL にチューブなどで溶解する。その内 3 uL を実験に使い、残りはストック溶液として、小分けにして -20°C で遮光保存する。

すでに調製済みの冷凍保存ストックがある場合ここで溶解し、使用時まで室温・遮光で保管します。

CAUTION

4 ug/uL のアクチノマイシン D/ DMSO ストック溶液は、小分けにして -20°C の暗所で保管し、調製後 1 ヶ月以内に使用して下さい。ストランド特異性を保つために、120 ng/uL のアクチノマイシン D 希釈液はこの時点では調製せず、p.46 で使用する直前に調製します。

RNA サンプルソースプレートの準備

7. 各 RNA サンプル 25 uL ずつ (0.05-4 ug の RNA を nuclease-free 水に溶解したもの) を、96 well Eppendorf twin.tec プレーートの各ウェルに分注します。NGS 自動化システムで処理するサンプルは、A1 から H1 へ、次に A2 から H2 へ、最後に A12 から H12 へとカラム (Column、列) 単位にプレートに入れます。

NOTE

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製のランでは、プレートの 1、2、3、4、6、12 カラムでのランが可能です。サンプルの配置に関する詳細は [2. Agilent NGS 自動化システムを使用した SureSelect RNA ライブラリ調製の p. 29](#) を参照して下さい。

Oligo(dT)ビーズと mRNA purification ソースプレートの準備

以下のソースプレートを準備する際、各ソースプレートの、上記ステップ 7 で分注した total RNA サンプルと対応するウェルに、指定の量の試薬を加えます。例えば、3 カラムランでは、ソースプレートの A1 から H3 のウェルに試薬を分注し、A4 から A12 のウェルは空のままにします。ビーズ以外のプレートは、底面に泡があると自動化システムでの吸引がうまくいかなくなりますので、必要に応じてシールして遠心し、底面の泡を抜いた後、シールをはがしてシステムにセットするようにしてください。

8. Oligo(dT) ビーズソースプレートを準備します。
 - a. **Oligo(dT) Microparticles** を、色が均一になるまでボルテックスで混合します。ボルテックスしてもビーズが集積していたら、ピペッティングで均一になるまで懸濁します。
 - b. p.31 にリストされている PCR プレートのうち、使用予定のサーマルサイクラに対応するプレートの、polyA 精製に使用する各ウェル(RNA サンプルを入れたウェルに対応するウェル全て)に、25 uL ずつの均一な **Oligo(dT) Microparticles** 懸濁液を分注します。
9. Bead Binding Buffer ソースプレートを準備します。30 uL の **RNA Seq Bead Binding Buffer** を、96 well Eppendorf twin.tec プレートの各ウェルに分注します。RNA サンプルを入れたウェルに対応するウェル全てに、試薬を加えます。
10. Bead Elution Buffer ソースプレートを準備します。30 uL の **RNA Seq Bead Elution Buffer** を、96 well Eppendorf twin.tec プレートの各ウェルに分注します。RNA サンプルを入れたウェルに対応するウェル全てに、試薬を加えます。
11. Bead Wash Buffer ソースプレートを準備します。410 uL の **RNA Seq Bead Washing Buffer** を、Nunc Deep Well プレートの各ウェルに分注します。RNA サンプルを入れたウェルに対応するウェル全てに、試薬を加えます。

マスターミックスソースプレートの準備

12. 表 8 には、マスターミックスソースプレートの各ウェルに分注する **RNA Seq Fragmentation Mix** の量を、ランするカラム数ごとに記載しています。ランするカラム数に応じた量の **RNA Seq Fragmentation Mix** を、Nunc Deep Well プレートのカラム 1 の全てのウェルに加えて、マスターミックスソースプレートを準備します。図 3 に、ソースプレート内の試薬の配置を示します。

3. サンプル調製

表 8 mRNA_Purification_v1.0.pro のマスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
RNA Seq Fragmentation Mix	Column 1 (A1-H1)	28.5 μ L	47.5 μ L	66.5 μ L	85.5 μ L	123.5 μ L	247.0 μ L

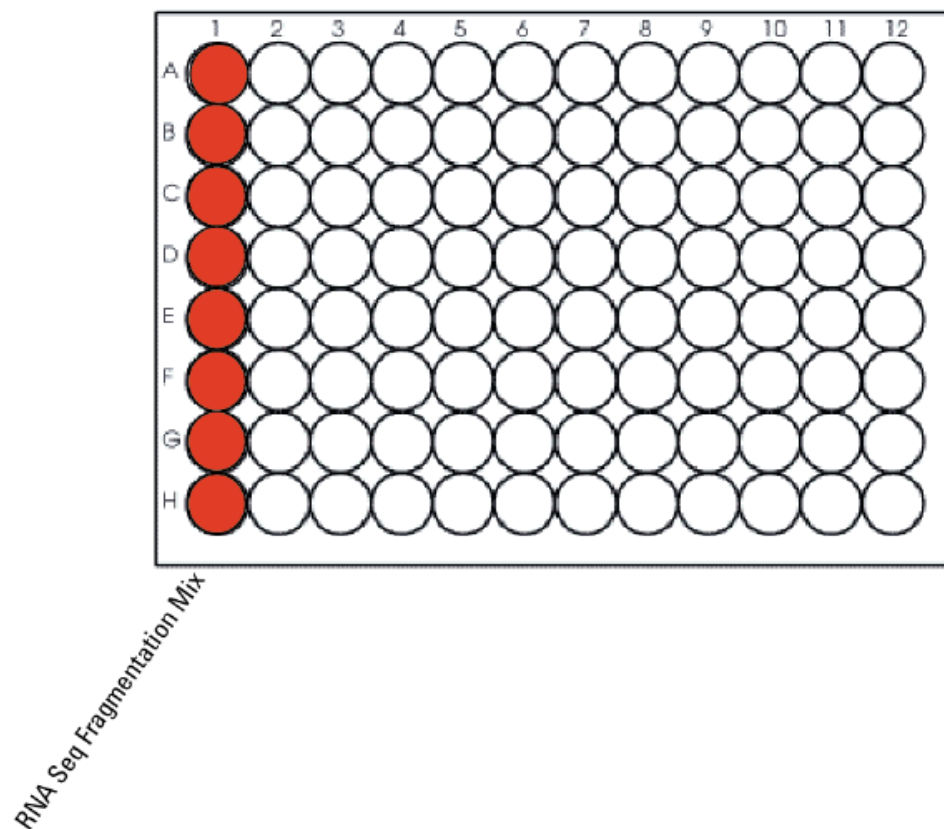


図 3 mRNA_Purification_v1.0.pro のマスターミックスソースプレートの状態

Agilent NGS 自動化システムにセット

13. 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 9 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。

表 9 mRNA_Purification_v1.0.pro 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty Corning 3344 Plate	Empty Corning 3344 Plate	Empty Corning 3344 Plate	Empty
Shelf 4	Empty	Bead Binding Buffer in twin.tec plate	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Bead Elution Buffer in twin.tec plate	Empty	Empty
Shelf 2	Empty tip box	Empty	Bead Wash Buffer in Nunc DeepWell plate	Empty
Shelf 1 (Bottom)	New tip box	Empty	Empty	Empty tip box

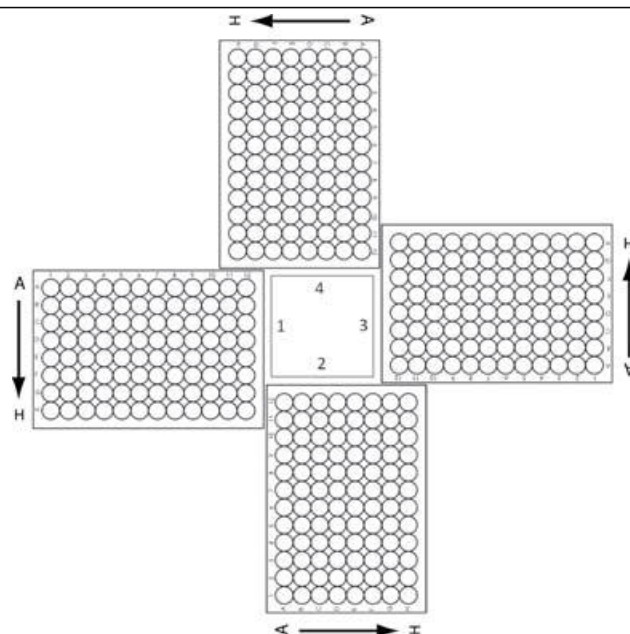


図 4 Agilent Labware MiniHub プレートの向き。Thermo Scientific リザーバーの時には、切り欠きのある角が MiniHub の中央に向くように置きます

必ず A1 の位置が上図に指定された向きでセットするように注意してください。この向きを間違えると、実験はただしく行われません。正しい位置に正しい向きで指定されたプレートを置くように十分に注意してください。

Initialize MiniHub のボタンがついている Form を使用して、MiniHub の電源を切ってプレート類をセットした場合、MiniHub の電源を再び入れた後に必ず Initialize MiniHub ボタンを押して、MiniHub をイニシャライズしてください。

3. サンプル調製

14. 表 10 にしたがって Bravo デッキにプレートを設定します。

Bravo デッキ 4 番と 6 番には赤いアルミニウムインサート、9 番にはシルバーの Nunc DeepWell プレートインサートを置き、その上に指定のプレートを設定して下さい。Bravo デッキ 4 番と 6 番には、以下ステップ 17 で、VWorks フォームのプルダウンメニューから選択するタイプの PCR プレート置いて下さい。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるように設定します。多少余裕がある場合は、デッキに正対して、左奥に向かって各プレートをきっちり押しつけるようにして設定してください。

表 10 mRNA_Purification_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
4	Oligo(dT) beads in PCR plate seated on red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2) (赤いインサートの上にプレートを置きます)
6	Empty PCR plate seated on red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2) (赤いインサートの上にプレートを置きます)
7	Total RNA samples in twin.tec plate
9	Master Mix Source Plate seated on silver insert (Nunc DeepWell: 液を入れた後のプレートの状態は図 3 を参照) (銀色インサートの上にプレートを置きます)

15. 表 11 に従って、チップボックスを BenchCel Microplate Handling Workstation に設定します。

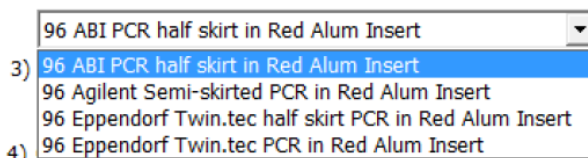
表 11 mRNA_Purification_v1.0.pro 用の BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
3	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	5 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	9 Tip boxes	Empty	Empty	Empty

VWorks プロトコル mRNA_Purification_v1.0.pro の実行

16. SureSelect セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **mRNA_Purification_v1.0.pro** を選択します。
17. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 4 番と 6 番に乘せる PCR プレートのタイプを選択します。ここで選択するプレートのタイプは、本プロトコル内でのインキュベーションステップで使用するサーマルサイクラに対応したものである必要があります。

2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling

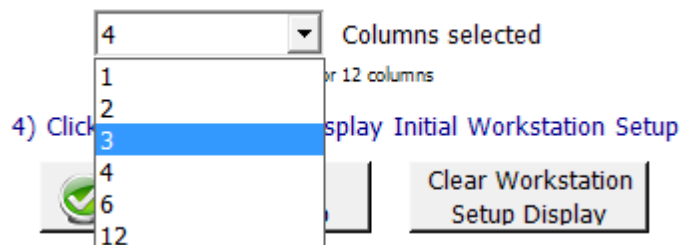


NOTE

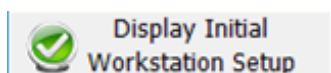
ランの準備の際には、Bravo デッキの 4 番と 6 番にはここでプルダウンから選択したタイプの PCR プレートをセットしていることを確認して下さい。ラン開始後に NGS 自動化システムが「4 番もしくは 6 番に PCR プレートを置いて下さい」というメッセージを出した際も、ここで指定したタイプの PCR プレートを用い、それ以外のプレートは置かないように注意して下さい。

18. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。

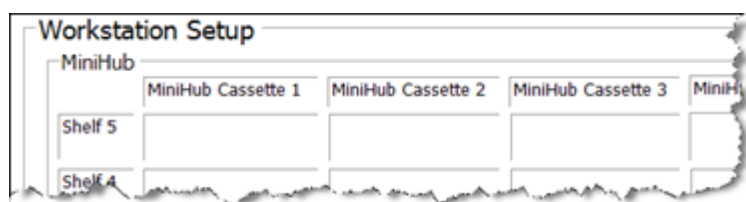
3) Select Number of Columns of Samples*



19. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。

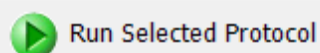


20. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



3. サンプル調製

21. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



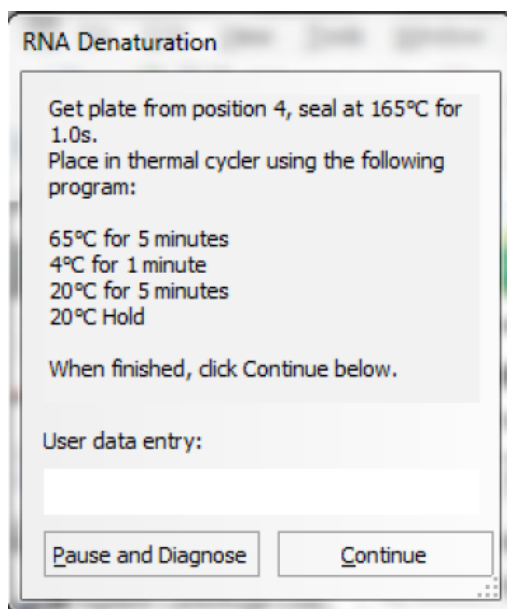
NOTE

Bravo の電源が入って最初のランのときには、Bravo の初期化に伴うエラーメッセージが出ます。グリッパー(**G Axis**)の確認メッセージが出た時には **Ignore**、続けて出る **W-axis** の確認メッセージには **Retry** を選択して、そのまま続けてください。ここで選択を間違えると、ランの最中にエラーで止まってしまうので、選択を間違えないようにご注意ください。

プロトコルを実行してもワークステーションの装置が反応していないが、Log には作動しているように記録されている場合、VWorks がシミュレーションモードで作動していないかどうかを確認してください。詳細は 25 ページを参照してください。

mRNA_Purification_v1.0.pro の実行には、サーマルサイクラ上でのインキュベーションを含めて約 90 分かかり、その後サーマルサイクラでのインキュベーションに 1 時間程度かかります。約 90 分の自動化プロトコルを実行している間、オペレーターは NGS 自動化システムの傍について、メッセージが出た際にサンプルプレートが自動化システムとサーマルサイクラの間で移動させる必要があります。**システムの傍を離れることはできませんのでご注意ください**。また、NGS 自動化システムはオペレーターの作業が必要な際に VWorks 画面上にメッセージを表示しますので、**本プロトコルのラン中はソフトウェア画面にご注意下さい**。具体的な操作については以下をご覧ください。

22. NGS 自動化システムが Oligo(dT)ビーズを RNA サンプルと混合し終わった後、次のメッセージが VWorks 画面上に表示されます。



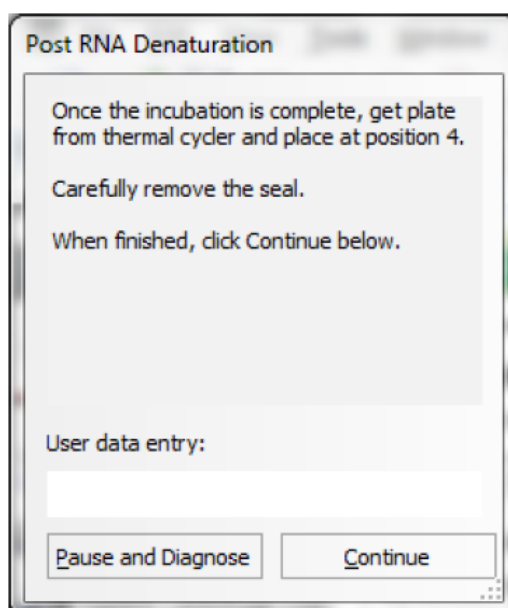
- a. Bravo デッキ 4 番にある赤いアルミニウムインサートの上から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。

- b. プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。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。
- c. PCR プレートを実験用サイクラに移し、表 12 の RNA 変性およびビーズ結合プログラムを実行します。実験用サイクラの Hot Top は使用します。実験用サイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。

表 12 RNA 変性と RNA-ビーズ結合の実験用サイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	65°C	5 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	20°C	5 minutes
Step 4	20°C	Hold

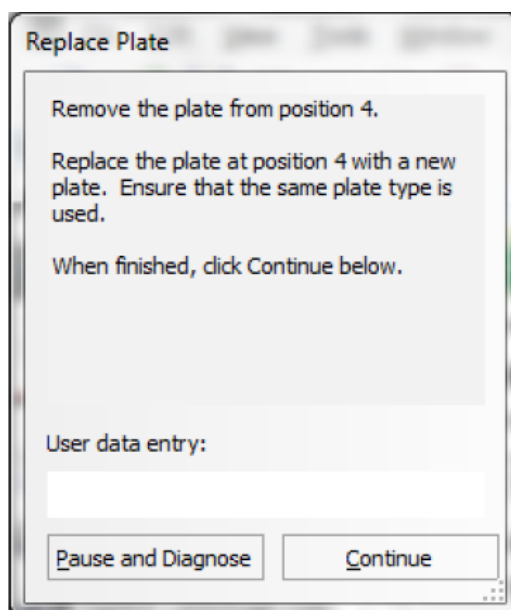
23. 次のメッセージが表示されたら、実験用サイクラが 20°C Hold のステップに達するまで待ちます。



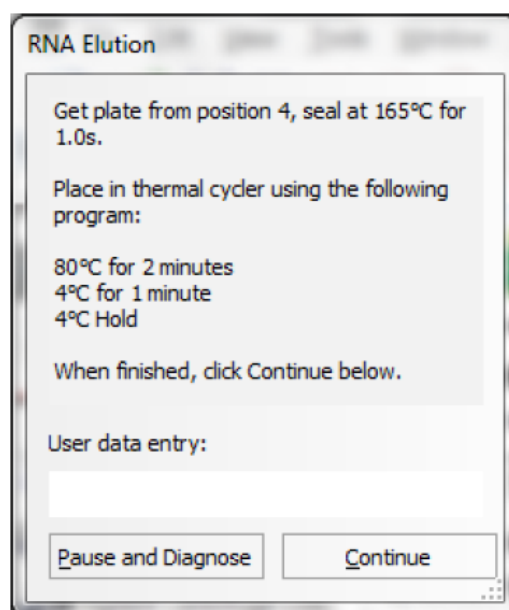
Hold ステップになったら、RNA サンプルを含んだ PCR プレートを実験用サイクラから Bravo デッキの 4 番上の赤いアルミニウムインサートの上に移します。液がはねないように注意深くプレートからシールをはがし、**Continue** をクリックします。

3. サンプル調製

24. NGS 自動化システムが、ビーズに結合した RNA サンプルの回収と洗浄の途中または後に、VWorks に次のメッセージが出ます。



- Bravo デッキ 4 番にある赤いアルミニウムインサートの上の PCR プレートを廃棄します。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
 - Bravo デッキ 4 番の赤いアルミニウムインサート上に、新しい PCR プレートを置きます。この PCR プレートは、上記 a で廃棄したプレートと同じタイプであり、ステップ 17 で、VWorks フォームのプルダウンメニューから選択したタイプの PCR プレートであることを確認して下さい。
 - PCR プレートを置いた後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。
25. NGS 自動化システムが、ビーズに結合した RNA サンプルの回収と洗浄を終了した後、VWorks に次のメッセージが出ます。

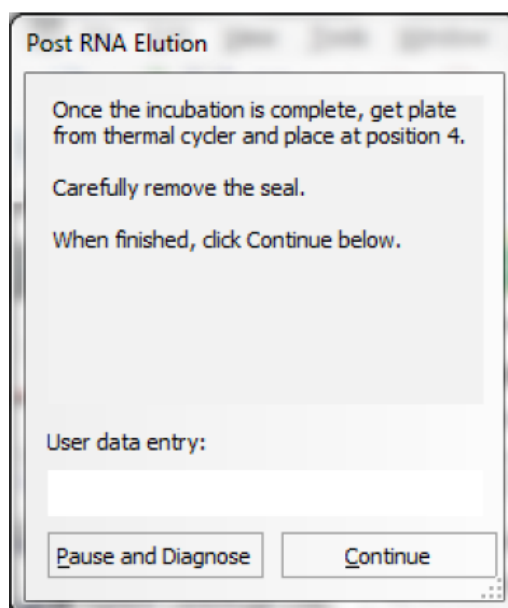


- a. Bravo デッキ 4 番にある赤いアルミニウムインサートの上から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
- b. プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
- c. PCR プレートをサーマルサイクラに移し、表 13 の RNA 溶出プログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。サーマルサイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。

表 13 RNA 溶出のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	80°C	2 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

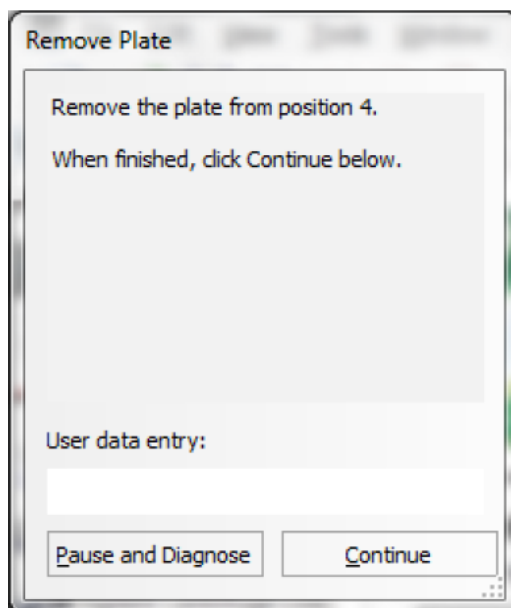
26. サーマルサイクラが 4°C の Hold のステップに達した後、次のメッセージが表示されたら、RNA サンプルを含んだ PCR プレートをサーマルサイクラから Bravo デッキの 4 番上の赤いアルミニウムインサートの上に移します。液がはねないように注意深くプレートからシールをはがし、**Continue** をクリックします。



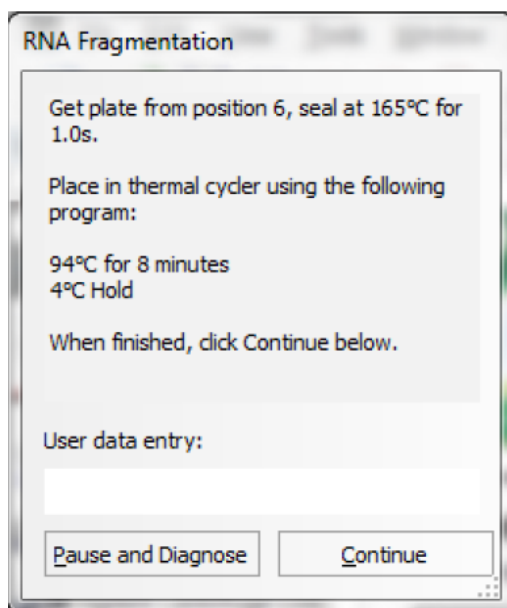
27. NGS 自動化システムは RNA Seq Bead Binding Buffer を溶出した RNA サンプルに加え、サンプルを室温で 5 分間保持して poly(A) RNA をビーズに再度結合させます。

3. サンプル調製

28. NGS 自動化システムが、ビーズに結合した RNA サンプルの回収と洗浄の途中または後に、VWorks に次のメッセージが出ます。赤いアルミニウムインサートは残したままで、Bravo デッキ 4 番から PCR プレートを取り、廃棄したら **Continue** をクリックします。



29. NGS 自動化システムは、[RNA Seq Fragmentation Mix](#) をビーズに結合した RNA サンプルに加え、RNA 断片化の準備を行います。準備が完了した後、VWorks は次のメッセージを表示します。



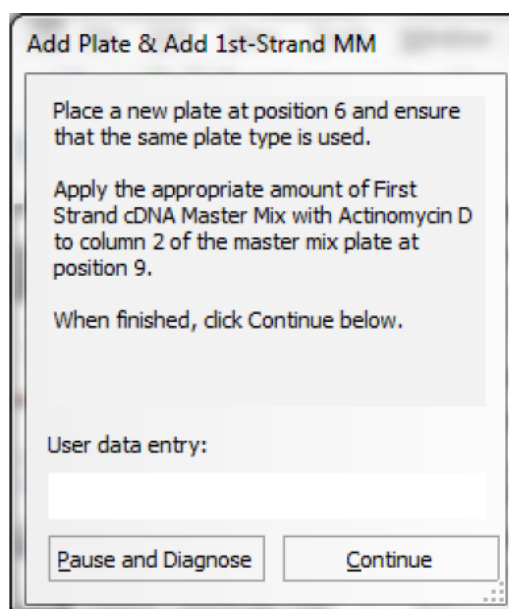
- Bravo デッキの 6 番からプレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
- プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドアウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
- PCR プレートをサーマルサイクラに移し、表 14 の RNA 断片化プログラムを実行します。サー

マルサイクラの Hot Top は使用します。サーマルサイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。(ここで **Continue** をクリックするとその直後に、次の STEP30 に示すメッセージが出ます。メッセージをよく読み、STEP30 の a から d の作業が終わるまで、このメッセージの Continue はクリックしないで下さい。)

表 14 RNA 断片化のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	94°C	8 minutes
Step 2	4°C	Hold

30. STEP29 のメッセージに **Continue** をクリックした直後に、次のメッセージが表示されます。



サーマルサイクラ中でサンプルを 94°C8 分間インキュベーションしている間に、第一鎖 cDNA 合成の試薬とワークステーションの準備を行います。

- a. 上のメッセージが表示されたら、新しい PCR プレート(ステップ 17 で、VWorks フォームのプルダウンメニューから選択したものと同じタイプの PCR プレート)を Bravo デッキの 6 番上の赤いアルミニウムインサートの上に置きます。次の Step b に直ちに進みます。
- b. 表 15 に従い、DMSO に溶かした 4 ug/uL アクチノマイシン D ストック溶液を、チューブなどで nuclease-free 水で 120 ng/uL に希釈します。

3. サンプル調製

表 15 120 ng / μ L アクチノマイシン D 希釈液の調製

Reagent	Volume for up to 12-column run (includes excess)
Actinomycin D (4 μ g/ μ L in DMSO)	3 μ L
Nuclease-free water	97 μ L
Total	100 μL

- c. 表 16 に従い、氷上で RNA Seq First Strand Master Mix とアクチノマイシン D 希釈液を、サンプル数に応じた量、チューブなどで混合します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

表 16 First Strand Master Mix とアクチノマイシン D の混合液

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
RNA Seq First Strand Master Mix	8.0 μ L	137.4 μ L	196.8 μ L	262.4 μ L	360.8 μ L	492.0 μ L	918.4 μ L
Actinomycin D (120 ng/ μ L in H ₂ O)	0.5 μ L	8.6 μ L	12.3 μ L	16.4 μ L	22.6 μ L	30.8 μ L	57.4 μ L
Total Volume	8.5 μL	146.0 μL	209.1 μL	278.8 μL	383.4 μL	522.8 μL	975.8 μL

- d. 表 17 に示された量の RNA Seq First Strand Master Mix/アクチノマイシン D 混合液を、Bravo デッキ 9 番にあるマスターミックスソースプレートの **カラム 2 の各ウェル** に分注します。

表 17 マスターミックスソースプレート

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
RNA Seq First Strand Master Mix + Actinomycin D mixture	Column 2 (A2-H2)	17.0 μ L	25.1 μ L	33.8 μ L	46.9 μ L	64.3 μ L	120.9 μ L

この時、ウェルの底に気泡が入っていないか、液が壁などに付いてしまっていないか目視で確認して下さい。液がウェルの底に入っていないと、Bravo が正しい量を分注できない可能性があります。図 5 にマスターミックスソースプレートの最終的な位置を示します。ソースプレートにマスターミックスを分注し終わったら VWorks スクリーンで **Continue** をクリックします。

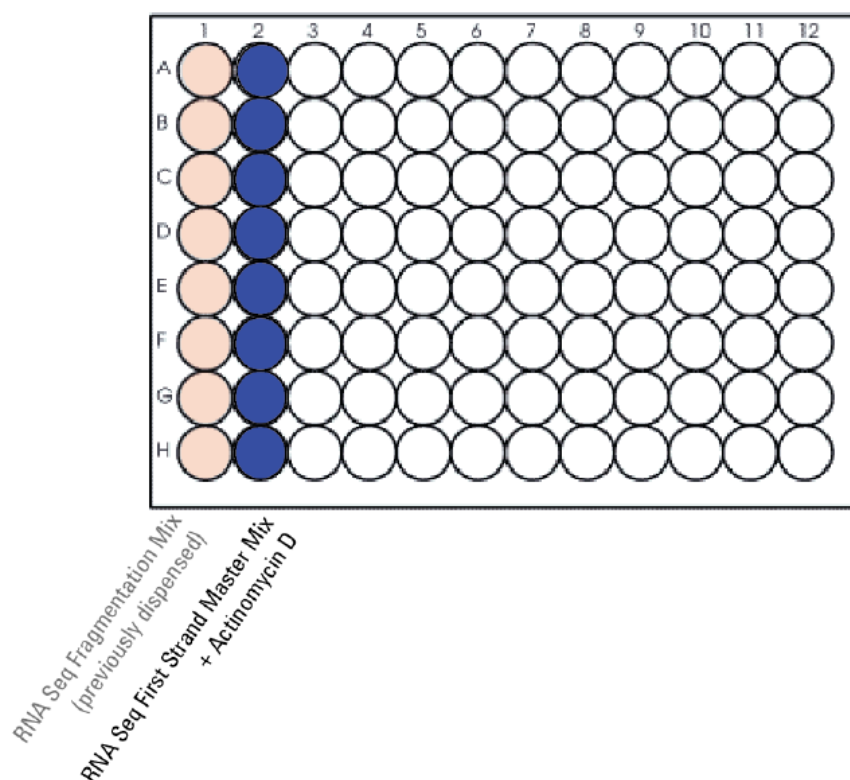
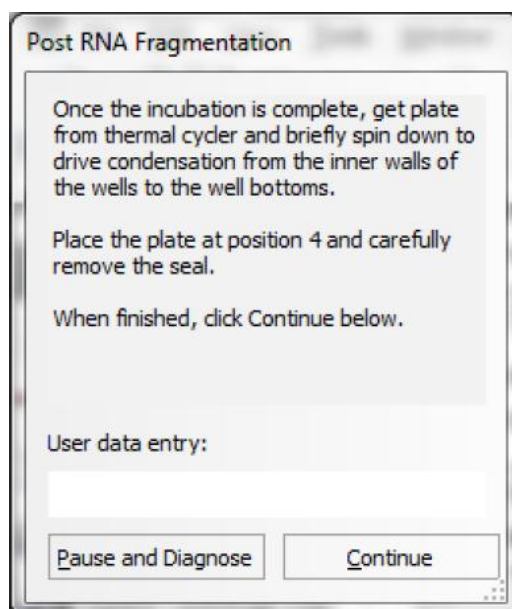


図 5 mRNA_Purification_v1.0.pro のマスターミックスソースプレートの最終的な状態

31. RNA サンプルを含む PCR プレートはサーマルサイクラ中にあるままで、自動化システムは第一鎖 cDNA 合成の他の試薬の準備を行います。準備が終わったら VWorks スクリーン上に次のメッセージが表示されます。

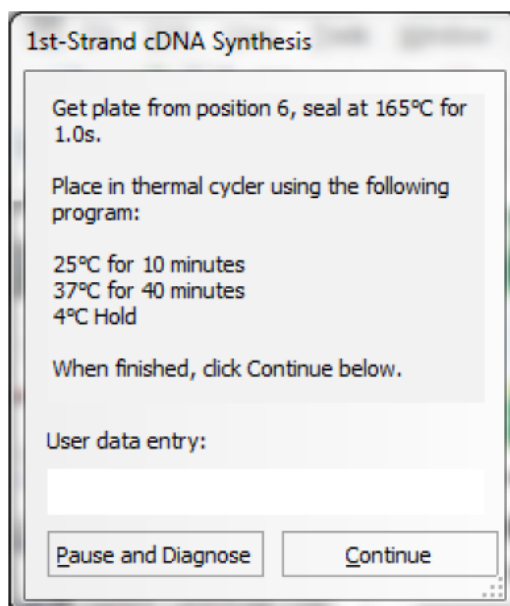


- a. サーマルサイクラが RNA 断片化プログラム(表 14)の 4°C の Hold ステップに達した後、サーマルサイクラからプレートを取り出し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

3. サンプル調製

- b. RNA サンプルを含んだプレート Bravo デッキ 4 番上の赤いアルミニウムインサートの上に置きます。
- c. 液がはねないように注意深くシールをはがし、**Continue** をクリックします。

32. NGS 自動化システムはビーズを含むウェルから断片化した RNA サンプルを回収し、サンプルを **RNA Seq First Strand Master Mix/アクチノマイシン D 混合液**と混ぜます。完了後に次のメッセージが表示されます。



- a. Bravo デッキの 6 番からプレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
- b. プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンし、液体をウェルの底に集めます。
- c. PCR プレートにサーマルサイクラに移し、表 18 の第一鎖 cDNA 合成のサーマルサイクラプログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。サーマルサイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。

表 18 第一鎖 cDNA 合成のサーマルサイクラプログラム

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

この待ち時間に、次の STEP の AMPureXP ビーズを必要量室温に戻しておくくと便利です。

ラン終了後に残った Labware MiniHub のカセット 1 の Shelf 1 と Shelf 2 にあるチップボックスは、精製の後のステップで使用するので、そのまま MiniHub 上に残しておいてください。Bravo デッキ 9 番の Nunc DeepWell プレートは廃棄します。

STEP2. AMPure XP ビーズを用いた第一鎖 cDNA の精製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムは AMPure XP ビーズと第一鎖 cDNA サンプルを Corning 3344 プレートに移して攪拌し、ビーズに結合した DNA を集め、洗浄して溶出する操作を実行します。

ワークステーションと試薬の準備

1. 前の mRNA_Purification_v1.0.pro ラン後に残った Labware MiniHub のカセット 1 の Shelf1 と Shelf2 にあるチップボックスは、精製の後のステップで使用するので、そのまま MiniHub 上に残しておいてください。間違えて片付けてしまった場合、カセット 1 の Shelf1 に、端から 2 列のみチップを除いた新しいチップボックスを、チップが除かれた側が MiniHub の外側を向くようにセットし、カセット 1 の Shelf2 には、端から 2 列のみ使用済みチップが入った空のチップボックスを、使用済みチップが入った側が MiniHub の外側を向くようにセットします。その他の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。Bravo デッキ 4 番と 6 番の赤いアルミニウムインサートと、Bravo デッキ 9 番のシルバーのアルミニウムインサートも片付けます。
2. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が、使用する 96 プレート類に直接かからないようにご注意ください。
3. チラー(ThermoCube)の電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
4. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XT ビーズ(4°C 保存)を室温に戻しておくようにします。最初の時点で 1 日に使用する量の AMPure XP ビーズをファルコンチューブなどに分注して、室温で置いておくとう便利です。24 検体を同時に処理する場合、アダプタ付 DNA ライブラリ調製のステップ全体で、9 mL の AMPure XP ビーズを使用します(この数値はピペットロス分を含んでいません)。
5. ビーズ懸濁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。
6. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ懸濁液 64 μ L を、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに入れます。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、ビーズを入れるようにしてください。
7. 20 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
8. 45 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。リザーバーの側面に nuclease-free 水と区別がつくように印をつけることをお勧めします。
1 日に使用する分の 70%エタノールであれば、まとめて調製して密閉できる容器で保存して使用可能です。1 日以上保存しないようにしてください。ここからアダプタ付き DNA ライブラリの増幅と精製まで 1 日で行う場合、必要量は 235 mL になります。(計量のロス分を含んでいません。)

3. サンプル調製

9. 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 19 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。

必ず A1 の位置が指定された向きでセットするように注意してください。この向きを間違えると、実験はただしく行われません。正しい位置に正しい向きで指定されたプレートを置くように十分に注意してください。また nuclease-free 水と 70%エタノールを入れたリザーバーには、切り欠きがあります。必ず切り欠きが MiniHub の内側を向くようにセットしてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けてセットしてしまうと、リザーバーの位置がずれ、BenchCel がリザーバーを運べなくなるトラブルが発生する危険性があります。

Initialize MiniHub のボタンがついている Form を使用して、MiniHub の電源を切ってプレート類をセットした場合、MiniHub の電源を再び入れた後に必ず Initialize MiniHub ボタンを押して、MiniHub をイニシャライズしてください。

表 19 AMPureXP_v1.1.pro:First Strand 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty Costar 3344 Plate	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf twin.tec Plate	Empty	Empty
Shelf 2	Used Tips – 2 columns on left *	Nuclease-free water reservoir from step 7	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 6	Empty
Shelf 1 (Bottom)	New Tips Minus 2 columns on left *	70% ethanol reservoir from step 8	Empty	Empty tip box

* 前の mRNA_Purification_v1.0.pro ラン後に残った Labware MiniHub のカセット 1 のチップボックスは、VWorks 画面上の Workstation Setup table では Shelf2 [Used Tips-2 columns on left] Shelf 1 [New tips Minus 2 columns on left]と記載されています。これら二つのチップボックスは AMPureXP_v1.1.pro:First Strand では使用されず、後のプロトコルで使用されます。これらのチップボックスは、後の LibraryPrep_RNASeq_ILMPv1.0.rst でチップが入っているポジション・空のポジションが正しい位置にセットされている必要があるため、前の mRNA_Purification_v1.0.pro ランから MiniHub に残しておく必要があります。

10. 表 20 に従って Bravo デッキにプレートを設定します。Bravo デッキ 9 番には、赤いアルミニウムインサートを置き、その上にプレートをセットするようにして下さい。プレートはデッキの枠内にきちんとおさまるようにセットします。多少余裕がある場合は、デッキに正対して、左奥に向かって各プレートをきっちり押しつけるようにしてセットしてください。

表 20 AMPureXP_v1.1.pro:First Strand 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
9	First-strand cDNA samples in PCR plate seated on red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2) (赤いインサートの上にプレートを置きます)

11. 表 21 に従って、チップボックスを BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

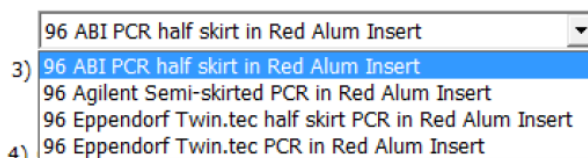
表 21 AMPureXP_v1.1.pro:First Strand 用の BenchCel の初期配置

No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
3	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	6 Tip boxes	Empty	Empty	Empty

VWorks プロトコル AMPureXP_v1.1.pro:First Strand の実行

12. セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **AMPureXP_v1.1.pro:First Strand** を選択します。
13. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキの 9 番にある、cDNA サンプルの入った PCR プレートのタイプを選択します。

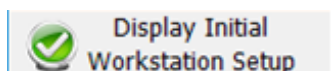
2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling



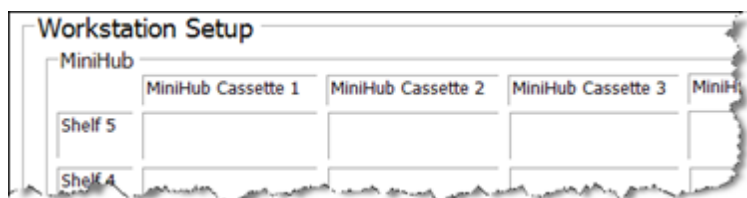
14. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。

3. サンプル調製

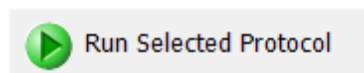
15. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。



16. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか**必ず**確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。前の mRNA_Purification_v1.0.pro ラン後に残った Labware MiniHub のカセット 1 のチップボックスは、VWorks 画面上の Workstation Setup table には表示されませんが、そのまま残しておいてください。



17. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



AMPure_v1.1.pro:First Strand プロトコルの実行には 3 カラムランの場合で約 45 分かかります。このランの間に次ページのライブラリ調製自動化プロトコルの試薬を準備して下さい。

完了すると精製 DNA サンプルは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf のプレートの中に入っています。**ここで実験をストップすることは出来ません。すぐに次のステップに進んでください。**

STEP3. Illumina Sequencing のための cDNA ライブラリ調製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムは第二鎖 cDNA 合成と、末端修復、A-tailing、アダプタ付加を含めた、シーケンシングに必要な end modification ステップを完了します。Agilent NGS 自動化システムは、調製された cDNA ライブラリを、各酵素反応の後に AMPure XP ビーズで精製します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

ワークステーションの準備

1. チラー(ThermoCube)の電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
2. 前の mRNA_Purification_v1.0.pro ラン後に残った Labware MiniHub のカセット 1 の Shelf1 と Shelf2 にあるチップボックスは、そのまま MiniHub 上に残しておいてください。間違えて片付けてしまった場合、カセット 1 の Shelf1 に、端から 2 列のみチップを除いた新しいチップボックスを、チップが除かれた側が MiniHub の外側を向くようにセットし、カセット 1 の Shelf2 には、端から 2 列のみ使用済みチップが入った空のチップボックスを、使用済みチップが入った側が MiniHub の外側を向くようにセットします。その他の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定(p,17)を参照し、Bravo デッキ 4 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 14°C に設定します。Bravo デッキ 4 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 1 に相当します。さらに Bravo デッキ 6 番の温度を Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで 4°C に設定します。Bravo デッキ 6 番は Inheco Multi TEC コントロールタッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。

精製試薬の準備

4. AMPure XP ビーズ懸濁液が室温になっていることを確認して下さい。決して凍らせないようにしてください。
5. ビーズ懸濁液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
6. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ懸濁液 168 µL を、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに入れます。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 という順番で、ビーズを入れるようにしてください。
7. 30 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
8. 100 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。リザーバーの側面に nuclease-free 水と区別がつくように印をつけることをお勧めします。

3. サンプル調製

マスターミックスソースプレートの準備

9. 表 22 を参照して RNA Seq Second Strand +End Repair Master Mix を必要量、調製します。

表 22 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst のための RNA Seq Second Strand + End Repair Master Mix の調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix	25.0 µL	307.5 µL	615 µL	820 µL	1127.5 µL	1640 µL	3075 µL
RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix	5.0 µL	61.5 µL	123 µL	164 µL	225.5 µL	328 µL	615 µL
Total Volume	30 µL	369 µL	738 µL	984 µL	1353 µL	1968 µL	3690 µL

10. 表 23 を参照して [SureSelect Ligation Master Mix](#) と [アダプタ](#) を含むアダプターライゲーションマスターミックスを必要量、調製します。

表 23 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst のためのアダプターライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
Nuclease-free water	2.5 µL	38.4 µL	61.5 µL	82.0 µL	112.8 µL	164.0 µL	307.5 µL
SureSelect Ligation Master Mix	5.0 µL	76.9 µL	123.0 µL	164.0 µL	225.5 µL	328.0 µL	615.0 µL
SureSelect Oligo Adaptor Mix	5.0 µL	76.9 µL	123.0 µL	164.0 µL	225.5 µL	328.0 µL	615.0 µL
Total Volume	12.5 µL	192.2 µL	307.5 µL	410.0 µL	563.8 µL	820.0 µL	1537.5 µL

11. 新しい Nunc DeepWell を用いて、Library Prep マスターミックスソースプレートを準備します。長時間同じプレートを使い続けることによって結露によりマスターミックスが希釈されてしまいますリスクを避けるために、このステップでは必ず新しい Nunc DeepWell を用いてください。表 24 に示された量の各マスターミックスを、表中に示されたカラムに分注します。1・2 は飛ばして、カラム 3 からカラム 5 までの分注になりますのでご注意ください。マスターミックスは分注操作の間、氷上に置いて下さい。図 6 にマスターミックスソースプレートの最終的な位置を示します。

表 24 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst のためのマスターミックスソースプレートの調製

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
RNA Seq Second Strand + End Repair Master Mix	Column 3 (A3-H3)	42.4 μ L	88.5 μ L	119.3 μ L	165.4 μ L	242.3 μ L	457.5 μ L
RNA Seq dA Tailing Master Mix	Column 4 (A4-H4)	30.0 μ L	50.0 μ L	70.0 μ L	90.0 μ L	130.0 μ L	260.0 μ L
Adaptor Ligation Master Mix (from Table 24)	Column 5 (A5-H5)	22.5 μ L	36.9 μ L	49.7 μ L	68.9 μ L	100.9 μ L	190.6 μ L

NOTE

新しい Nunc DeepWell プレートを Library Prep マスターミックスソースプレートとして使う場合も、カラム 1 とカラム 2 はからのまま、PCR マスターミックスを新しい Nunc DeepWell プレートのカラム 3 からカラム 5 までに分注して下さい。

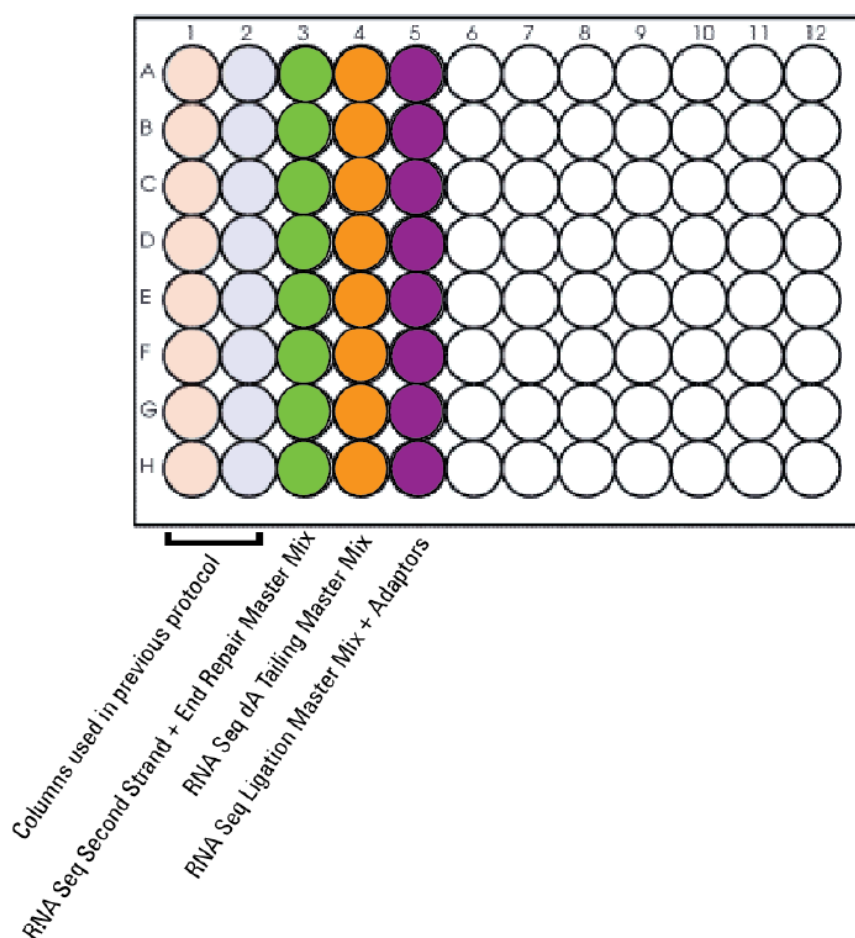


図 6 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst 用マスターミックスソースプレートの状態

3. サンプル調製

12. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165℃、1.0 秒です。
13. プレートを 30 秒間、1000g で遠心し、壁やプレートシールについた液をスピンドウンし、気泡を除きます。マスターミックスソースプレートは氷上に置いておきます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがすときに反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo 液体分注プラットフォームで正確に容量が測れないことがあります。必ずソースプレートをランの前にシールし、遠心してください。

Agilent NGS 自動化システムにセット

14. 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 25 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。正しい位置に正しい向きで指定されたプレートを置くように十分に注意してください。

表 25 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty	Empty Corning 3344 Plate	Empty Corning 3344 Plate	Empty
Shelf 4	Empty	Empty Eppendorf twin.tec plate	Empty Eppendorf twin.tec plate	Empty
Shelf 3	Empty	Empty	Empty Eppendorf twin.tec plate	Empty
Shelf 2	Waste tip box (retained from mRNA_Purification protocol)	Nuclease-free water reservoir from step 7	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 6	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Clean tip box (retained from mRNA_Purification protocol)	70% ethanol reservoir from step 8	Empty	Empty tip box

※それぞれのプレートとリザーバーを MiniHub に置くときの向きに十分に注意してください。A1 ポジションを決められた方に向けてセットします。リザーバーの切り欠きは MiniHub の内側に向けてセットします。また nuclease-free 水と 70%エタノールを入れたリザーバーには、切り欠きがあります。リザーバーをセットする場合、必ず切り欠きが MiniHub の内側を向くようにセットしてください。切り欠きを MiniHub の外側に向けてセットしてしまうと、リザーバーの位置がずれ、BenchCel がリザーバーを運べなくなるトラブルが発生する危険性があります。

第二鎖 cDNA の合成と末端修復の 16℃、30 分のインキュベーションは、室温の影響を避けるために、ABI の MicroAmp プレートをサーマルサイクラに移して、インキュベーションします。本ステップでは、ABI の MicroAmp プレートがセットできるサーマルサイクラをご使用ください。

15. 表 26 にしたがって Bravo デッキにプレートを設定します。

表 26 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
6	Empty ABI MicroAmp plate in Black Carrier (ブラックアダプタの上にプレートを置きます。)
7	Purified first-strand cDNA samples in Eppendorf twin.tec.plate. Oriented with well A1 in the upper-left
9	Library Prep Master Mix Source Plate (Nunc DeepWell, unsealed and seated on silver insert (銀色インサートの上にプレートを置きます))

表 27 のように BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスを設定します。

表 27 LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst 用の BenchCel の初期配置

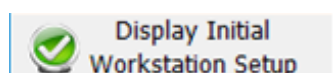
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
2	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
3	4 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	5 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	7 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	11 Tip boxes	3 Tip boxes	Empty	Empty

VWorks プロトコル LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst の実行

16. セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst** を選択します。

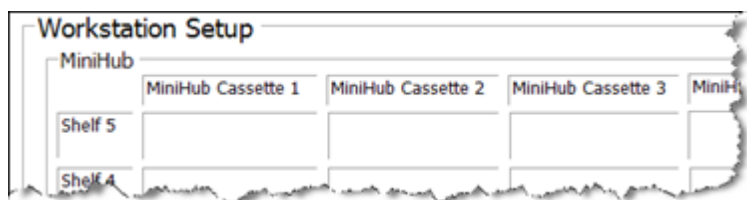
17. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。1 カラムが 8 サンプル分に相当します。

18. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。

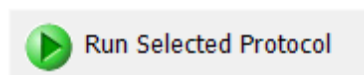


19. NGS 自動化システムがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。

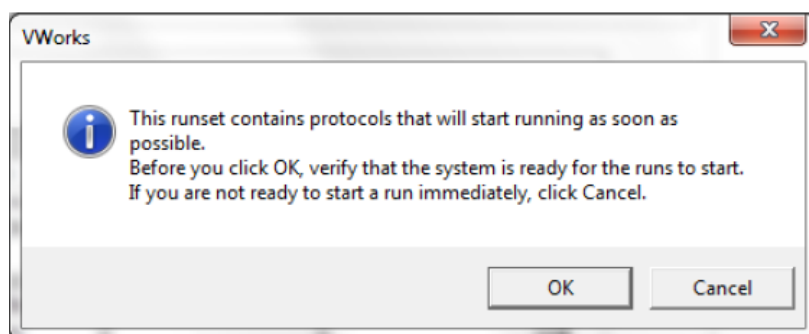
3. サンプル調製



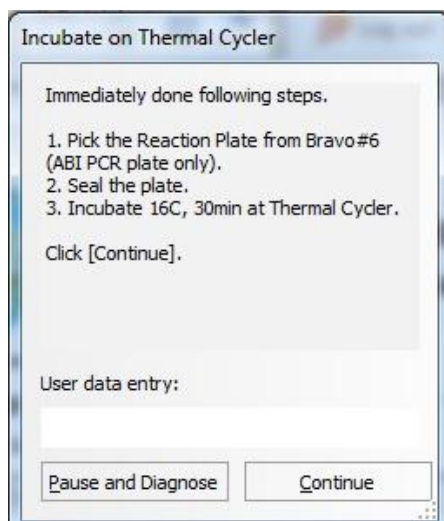
20. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



21. ランの準備が完了したら、次のウィンドウの **OK** をクリックしてください。



LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.4.JP.rst の実行には 24 サンプルの場合、全体で 2 時間 35 分程度かかります。開始約 5 分後、RNA Seq Second Strand+End Repair Master Mix と第一鎖 cDNA サンプルを混ぜ、チップボックスの準備をしたところで、次のメッセージが画面に出ます。



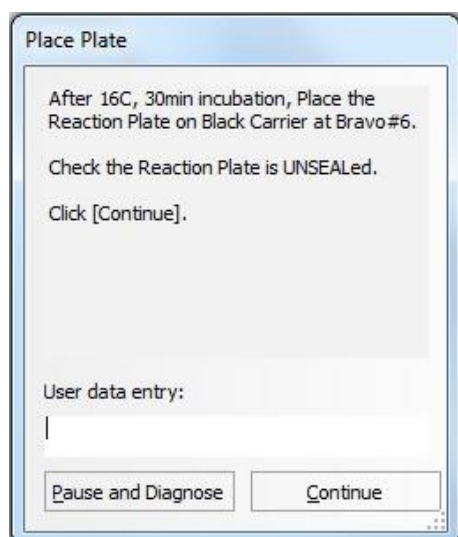
- Bravo デッキ 6 番にあるブラックアダプタの上の ABI PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Micropalte Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。ブラックアダプタはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
- プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
- PCR プレートにサーマルサイクラに移し、表 28 の第二鎖 cDNA 合成と末端修復のサーマル

プログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないでください。この点に十分注意してください。**サーマルサイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。

表 28 第二鎖 cDNA 合成と末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	16°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

- d. サーマルサイクラが 4°C の Hold のステップに達した後、次のメッセージが表示されたら、cDNA サンプルを含んだ PCR プレートを手動サイクラから Bravo デッキの 6 番上のブラックアダプタの上に移します。液がはねないように注意深くプレートから**シールをはがし**、**Continue** をクリックします。



プログラムが完了すると精製されたアダプタ付 cDNA サンプルは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf のプレートの中に入った状態になります。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルはプレートにシールもしくはキャップをした状態で -20°C で保管することができます。

3. サンプル調製

STEP4. アダプタ付き cDNA ライブラリのインデックス付加と増幅

このステップでは NGS 自動化システムは、アダプタ付き cDNA を、適切なインデックスプライマーを含む 3 種類のプライマーによって PCR 増幅します。自動化システムが反応溶液の分注を完了した後、PCR 増幅のために PCR プレートにサーマルサイクラに移してください。ライブラリ調製に用いた、最初の Total RNA サンプルの量に応じたサイクル数で増幅する必要があります。

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。表 29 と表 30 に記載された試薬を氷上で溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

ワークステーションの準備

1. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
2. Labware MiniHub と BenchCel 上のプレートとチップボックスは、すべて片付けてください。
3. Bravo デッキヒートブロックの温度設定(p. 17)を参照し、Inheco Multi TEC Control タッチスクリーンを使ってBravoデッキ6番の温度をあらかじめ4°Cに設定してください。Bravoデッキ6番はInheco Multi TEC Control タッチスクリーンで CPAC 2 2 に相当します。

インデックスソースプレートの準備

1. 5 uL の適切なインデックスプライマー([RNA Seq Index A01-H06](#) または 1 番から 48 番, 8bp)を PCR プレートの適切なウェルに加えます。プールして同じレーンでシーケンスする予定のサンプルには、異なるインデックスプライマーを使用して下さい。PCR プレート中の各 Index Primer を入れるウェルの位置は、最初に Total RNA サンプルを分注したプレート中の、各 RNA サンプルの位置に対応させる必要があります。このステップで cDNA ライブラリを増幅するために使用する新、旧それぞれのインデックスプライマーのインデックス部分の配列については、使用しているインデックスの種類をよく確認のうえ、巻末のリファレンスを参照して下さい。

CAUTION**新 8 bp のインデックスプライマー (A01-H06)**

96 反応では、5500-0135 のキットの中の青色ウェルプレートの中に入っています。

RNA Seq Index A01-H06 までのインデックスを使用して下さい。96 反応キットには、A07-H12 までのインデックスも含まれますが、他の SureSelect プロトコルで使用するためのもので、本 mRNA シーケンシングプロトコルでは使用しません。

旧来の 8 bp のインデックスプライマー (1-48)

96 反応では、5500-0117 のキットの中の透明ウェルプレートの中に入っています。

RNA Seq Index 1 - 48 までのインデックスを使用して下さい。96 反応キットには、49 - 96 までのインデックスも含まれますが、他の SureSelect プロトコルで使用するためのもので、本 mRNA シーケンシングプロトコルでは使用しません。

3. サンプル調製

マスターミックスソースプレートの調製

- 表 29 に従って、**RNA Seq ILM Reverse PCR Primer** の 1:20 希釈液を作製します。サンプル数にあわせて、希釈液の量を調節してください。

表 29 96 反応ランの場合の Reverse Primer 希釈液の調製 (24 反応ランの場合下記を 1/4 量作製)

Reagent	Volume for up to 96 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	114 µL
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	6 µL
Total	120 µL

- 表 30 に従って、適切な量の PCR 反応マスターミックスを調製します。ボルテックスでよく攪拌し、氷上に置きます。

表 30 PCR 反応マスターミックスの調製

SureSelect Reagent	Volume for 1 Library	Volume for 1 Column	Volume for 2 Columns	Volume for 3 Columns	Volume for 4 Columns	Volume for 6 Columns	Volume for 12 Columns
RNA Seq PCR Master Mix	25.0 µL	307.5 µL	512.5 µL	717.5 µL	922.5 µL	1332.5 µL	2665 µL
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1.0 µL	12.3 µL	20.5 µL	28.7 µL	36.9 µL	53.3 µL	106.6 µL
SureSelect Primer (Forward primer)	1.0 µL	12.3 µL	20.5 µL	28.7 µL	36.9 µL	53.3 µL	106.6 µL
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer (1:20 from Table 27)	1.0 µL	12.3 µL	20.5 µL	28.7 µL	36.9 µL	53.3 µL	106.6 µL
Total Volume	28 µL	344.4 µL	574.0 µL	803.6 µL	1033.2 µL	1492.4 µL	2984.8 µL

- 新しい Nunc DeepWell ソースプレートの **Column6** (A6-H6) の各ウェルに、表 31 に示した量の PCR 反応マスターミックスを加えます。マスターミックスソースプレートの最終的な位置をに示します。

表 31 TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro のマスターミックスソースプレートの準備

Master Mix Solution	Position on Source Plate	Volume of Master Mix added per Well of Nunc Deep Well Source Plate					
		1-Column Runs	2-Column Runs	3-Column Runs	4-Column Runs	6-Column Runs	12-Column Runs
PCR Reaction Mix	Column 6 (A6-H6)	39.6 µL	68.3 µL	97.0 µL	125.7 µL	183.1 µL	369.6 µL

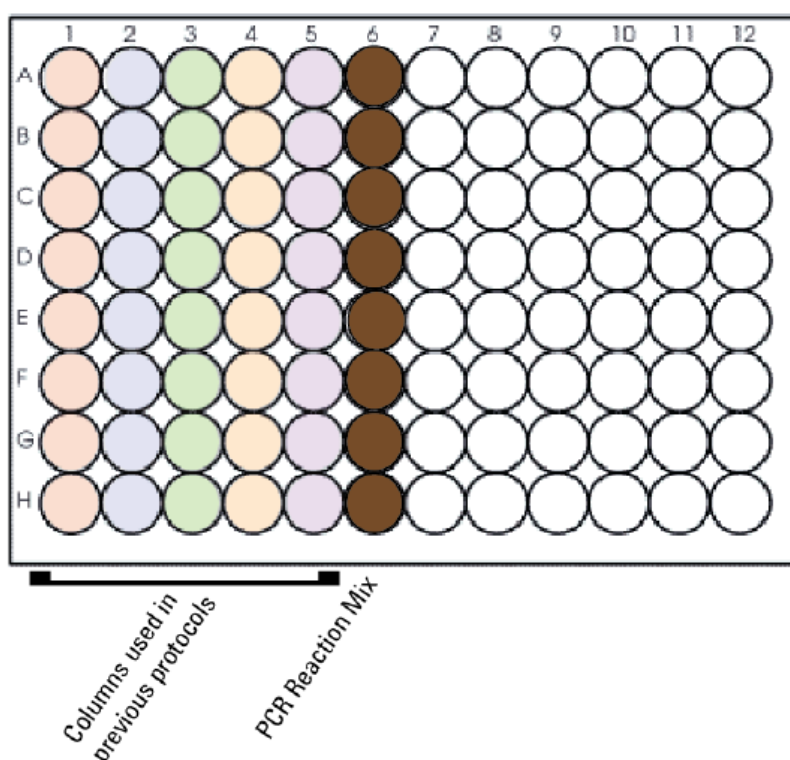


図 7 TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro 用マスターミックスソースプレートの状態。コラム 1-5 にはなんにも入れず、コラム 6 を使用します。

7. マスターミックスソースプレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートをシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
8. プレートを 30 秒間遠心し、壁やプレートシールについた液を落とし、気泡を除きます。プレートシールは Bravo デッキにセットする前にはがします。はがすときに反動で液がはねないように注意してください。

NOTE

ソースプレートの溶液に泡があると Bravo 液体分注プラットフォームで正確に容量が測れないことがあります。必ずソースプレートをランの前にシールし、遠心してください。

3. サンプル調製

Agilent SureSelect^{XT} 自動化システムにセット

9. 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 32 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。

表 32 TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 2	Empty tip box	Empty	Empty	Empty
Shelf 1 (Bottom)	New tip box	Empty	Empty	Empty tip box

10. 表 33 に従って Bravo デッキにプレートをセットします。Bravo デッキ 9 番にはシルバーのアルミニウムインサートを置き、その上にプレートをセットして下さい。cDNA プレートを-20℃で保存していた場合は、溶かした後攪拌し、遠心してから使用して下さい。

表 33 TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
6	RNA Seq Indexes in PCR plate seated on red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2) (赤いインサートの上にプレートを置きます)
7	Prepped cDNA samples in Eppendorf twin.tec plate, oriented with well A1 in the upper-left
9	Master mix source plate (Nunc DeepWell), unsealed and seated on silver insert (銀色インサートの上にプレートを置きます)

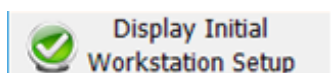
11. 表 34 のように BenchCel Microplate Handling Workstation にチップボックスをセットします。

表 34 TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro 用の BenchCel の初期配置

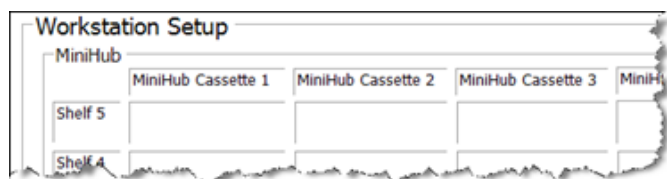
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
3	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
4	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
6	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
12	1 Tip box	Empty	Empty	Empty

VWorks プロトコル TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro の実行

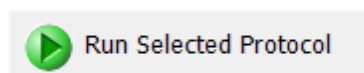
13. セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro** を選択します。
14. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキ 6 番にある、RNA Seq Index の入った PCR プレートのタイプを選択します。
15. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
16. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。



17. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか必ず確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。

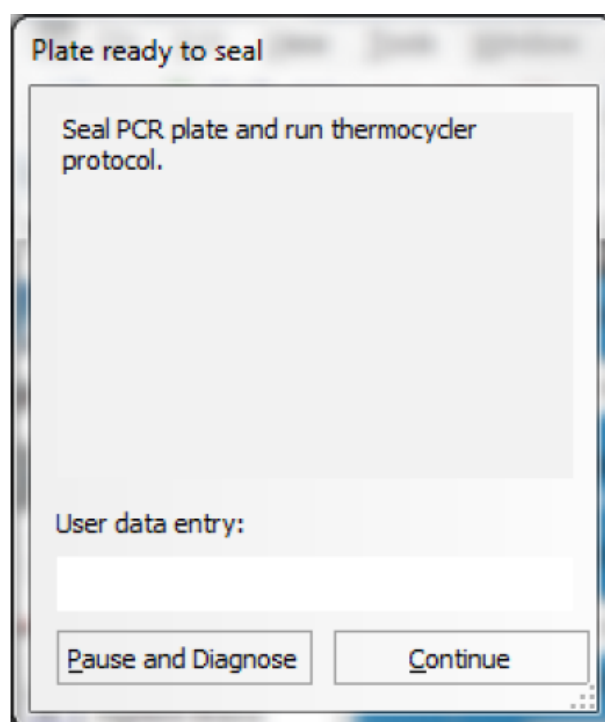


18. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



19. TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro の実行には約 15 分かかります。完了すると、調製した DNA と PCR マスターミックス、RNA Seq Index が混合した、PCR にかけるだけのサンプルが Bravo デッキの 6 番の PCR プレートに入った状態になります。この状態になると、次のメッセージが画面に出ます。

3. サンプル調製



- Bravo デッキ 6 番にある赤いアルミニウムインサートの上から PCR プレートを取り、PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は 165°C、1.0 秒です。赤いアルミニウムインサートはそのまま Bravo デッキ上に残しておきます。
- プレート遠心器か mini-plate spinner で 30 秒間スピンドウンし、液体をウェルの底に集めます。
- PCR プレートをサーマルサイクラに移し、表 35 の PCR プログラムを実行します。液量は 50 μ L です。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。サーマルサイクラプログラム実行開始後、VWorks 画面上で **Continue** をクリックします。

表 35 mRNA Library Indexing PCR のサーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	37°C	15 minutes
2	1	95°C	2 minutes
3	10–16 cycles (see Table 34)	95°C	30 seconds
		65°C	30 seconds
		72°C	1 minute
4	1	72°C	5 minutes
5	1	4°C	Hold

表 36 mRNA Library Indexing PCR サイクル数の推奨

Amount of total RNA used for library prep	Cycle Number
50 ng–200 ng	14–16
201 ng–2 µg	12–14
2.1 µg–4 µg	10–12

NOTE

最少 total RNA 量である 50 ng からスタートした場合、このインデックス PCR 増幅プログラムでは 16 サイクルで増幅して下さい。

この時点で PCR 終了後の精製に用いる AMPure XP ビーズを、必要量室温に戻しておくと便利です。

3. サンプル調製

STEP5. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムは、AMPure XP ビーズと増幅したアダプタ付き cDNA を Nunc DeepWell プレートに移して攪拌し、ビーズに結合した DNA を集め、洗浄して溶出する操作を実行します。

ワークステーションと試薬の準備

1. Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。
2. NucleoClean decontamination スプレー溶液をキムワイプなどに含ませて、Labware MiniHub、Bravo デッキ、および BenchCel をやさしく拭いてください。NucleoClean decontamination スプレー溶液が、使用する 96 プレート類に直接かからないようにご注意ください。
3. チラーの電源を入れ、0°C にセットします。Bravo デッキの 9 番が相当します。チラーリザーバーは少なくとも 300 mL の 25%エタノールを含むことを確認してください。
4. AMPure XP ビーズが室温であることを確認してください。(使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4°C 保存)を室温に戻しておくようにします)
5. ビーズ懸濁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。
6. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ懸濁液 138 μ L を、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに入れます。使用するサンプル数にあわせて、必ず A1 から H1 に、続いて A2 から H2 にという順番で、ビーズを入れるようにしてください。
7. 30 mL の nuclease-free 水を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。
8. 90 mL の新しく調製した 70%エタノールを入れた Thermo Scientific リザーバーを準備します。

NOTE

ここで準備する AMPure XP ビーズ、nuclease-free 水、70%エタノールは、本 Step5 と次に続く Step6 の、計 2 回の AMPure ビーズ精製の分を含みます。本自動化プログラムでは、アダプターダイマー除去のステップも必ず行うようになっています。このプロトコル終了後ワークステーションから片付けてしまわずに、次の AMPure ステップに使用して下さい。

9. 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 37 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。

表 37 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty Nunc DeepWell plate	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf twin.tec Plate	Empty	Empty
Shelf 2	Empty	Nuclease-free water reservoir from step 7	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate from step 6	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Empty	70% ethanol reservoir from step 8	Empty	Empty tip box

※それぞれのプレートとリザーバーを MiniHub に置くときの向きに十分に注意してください。A1 ポジションを決められた方に向けてセットします。リザーバーの切り欠きは MiniHub の内側に向けてセットします。

10. 表 38 のように Bravo デッキにプレートをセットします。Bravo デッキ 9 番には、赤いアルミニウムインサートを置き、その上にプレートをセットして下さい。

表 38 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Empty waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells)
9	Amplified cDNA samples in PCR plate, unsealed and seated on red insert (PCR plate type must be specified on setup form under step 2)

(赤いインサートの上にプレートを置きます)

3. サンプル調製

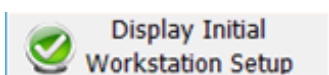
11. 表 39 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 39 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR 用の BenchCel の初期配置

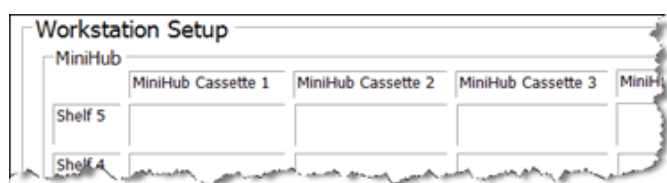
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
3	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	6 Tip boxes	Empty	Empty	Empty

VWorks プロトコル AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR の実行

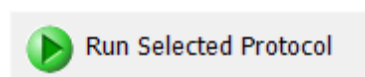
12. セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR** を選択します。
13. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、Bravo デッキ 9 番にある、cDNA サンプルの入った PCR プレートのタイプを選択します。
14. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
15. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。



16. ワークステーションがフォームの Workstation Setup 領域に示されているようにセットアップできているか**必ず**確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



17. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



本精製ステップには 3 カラムランの場合で約 45 分かかります。完了すると精製 cDNA サンプルは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf プレートの中に入った状態になります。

製試薬(Labware MiniHub のカセット 2 の Shelf 2 に乗っている Nuclease-free 水の入ったリザーバー、カセット 2 の Shelf 1 に乗っている 70%エタノールの入ったリザーバー、カセット 3 の Shelf 2 に乗っている AMPure XP ビーズの入った Nunc DeepWell プレート)は次のステップでそのまま使用するため、本ステップ終了後に片付けてしまわずに、そのまま MiniHub に残しておいて下さい。また Bravo デッキ 1 番の Axygen のリザーバーも次のステップで使用するため、そのまま残しておいて下さい。

3. サンプル調製

STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによる Adaptor-dimer の除去

このステップでは、Agilent NGS 自動化システムは、前ステップで精製されたアダプタ付き cDNA をもう一度 AMPure XP ビーズを用い精製し、Adaptor dimer を Sequencing 前に除去する操作を実行します。

ワークステーションと試薬の準備

- STEP5 の AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome PCR で使用した精製試薬(Labware MiniHub のカセット 2 の Shelf 2 に乗っている Nuclease-free 水の入ったリザーバー、カセット 2 の Shelf 1 に乗っている 70%エタノールの入ったリザーバー、カセット 3 の Shelf 2 に乗っている AMPure XP ビーズの入った Nunc DeepWell プレート)は MiniHub から取り除かずにそのまま置いておきます。それ以外の Labware MiniHub と BenchCel のプレートとチップボックスをすべて片付けます。Bravo デッキ 7 番の Eppendorf プレートには、前ステップで精製された cDNA が入っているので、注意して下さい。
- Bravo デッキ 1 番の廃液リザーバーはそのまま残しておき、その他の Bravo 上のプレートとチップボックスを全て片付けます。
- チラーの電源が前ステップから引き続き On になっており、Bravo デッキの 9 番が 0°Cにセットされていることを確認します。
- 図 4 に示すプレートの向きを参考に、表 40 にしたがって Labware MiniHub に試薬をセットします。

表 40 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers 用の MiniHub の初期配置

Vertical Shelf Position	Cassette 1	Cassette 2	Cassette 3	Cassette 4
Shelf 5 (Top)	Empty Corning 3344 Plate	Empty	Empty	Empty
Shelf 4	Empty	Empty	Empty	Empty
Shelf 3	Empty	Empty Eppendorf twin.tec Plate	Empty	Empty
Shelf 2	Empty	Nuclease-free water reservoir (retained from previous protocol)	AMPure XP beads in Nunc DeepWell plate (retained from previous protocol)	Empty
Shelf 1 (Bottom)	Empty	70% ethanol reservoir (retained from previous protocol)	Empty	Empty tip box

5. 表 41 のように Bravo デッキにプレートを設定します。Bravo デッキ 9 番には、赤いアルミニウムインサートを置き、その上にプレートを設定して下さい。

表 41 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers 用の Bravo デッキの初期配置

Location	Content
1	Waste reservoir (Axygen 96 Deep Well Plate, square wells, retained from previous protocol)
9	Once-purified cDNA samples in Eppendorf twin.tec plate seated on red insert (full-skirted twin.tec plate type must be specified on setup form under step 2) (赤いインサートの上にプレートを置きます)

6. 表 42 にしたがって BenchCel Microplate Handling Workstation にセットします。

表 42 AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers 用の BenchCel の初期配置

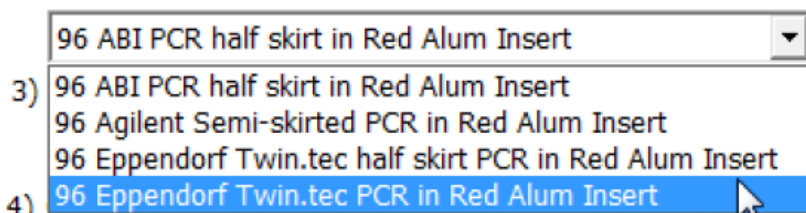
No. of Columns Processed	Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4
1	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
2	1 Tip box	Empty	Empty	Empty
3	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
4	2 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
6	3 Tip boxes	Empty	Empty	Empty
12	6 Tip boxes	Empty	Empty	Empty

3. サンプル調製

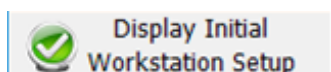
VWorks プロトコル AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers の実行

7. セットアップフォームの **Select Protocol to Run** の下の **AMPureXP_v1.1.pro:Transcriptome Dimers** を選択します。
8. **Select PCR plate labware for Thermal Cycling** の下のプルダウンメニューから、「**96 Eppendorf Twin.tec PCR in Red Alum Insert**」を選択します。

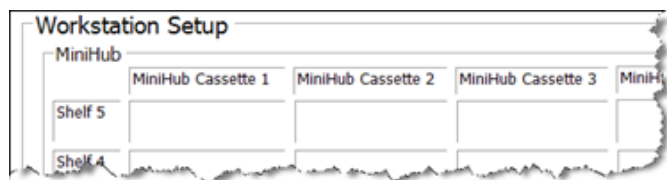
2) Select PCR Plate labware for Thermal Cycling



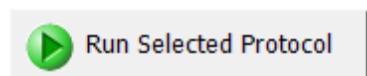
9. 使用するサンプルのカラム数を選択してください。1、2、3、4、6、または 12 カラムが選択できます。
10. **Display Initial Workstation Setup** をクリックします。



11. ワークステーションがフォームの **Workstation Setup** 領域に示されているようにセットアップできているか**必ず**確認してください。このステップでセットアップ位置をダブルチェックするようにしてください。



12. 確認後 **Run Selected Protocol** をクリックしてください。



本精製ステップには 3 カラムランの場合で約 45 分かかります。完了すると精製 cDNA サンプルは Bravo デッキの 7 番にある Eppendorf プレートの中に入った状態になります。最終液量は約 25 μ L になります。

STEP7. DNA サンプルのサイズチェックと定量

Option 1: Agilent 2100 バイオアナライザによる品質チェック

バイオアナライザ DNA 1000 チップと試薬アッセイを用いて測定します。

1. PlateLoc Thermal Microplate Sealer でプレートを実行します。設定は、165°C、1.0 秒です。
2. 各ウェルのサンプルを均一にするためプレートを 5 秒ボルテックスした後、30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。
3. バイオアナライザの電極を洗浄します。電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350µL 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。
4. Agilent 2100 expert ソフトウェア (version B.02.02 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。
5. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。1 µL のサンプルを分析に使用します。
6. 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。
7. バイオアナライザの assay のメニューから、DNA 1000 assay を選択します。
8. 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。
9. 結果をチェックします。図 8 の泳動図のような分布が得られ、およそ 200-600 bp の位置にあるピークを積分して、ライブラリの濃度 (ng/µL) を測定します。得られた濃度がバイオアナライザ DNA 1000 キットの直線範囲内にあることを確認して下さい。濃すぎる場合は正確な定量値が得られないため、希釈をして再度測定して下さい。

3. サンプル調製

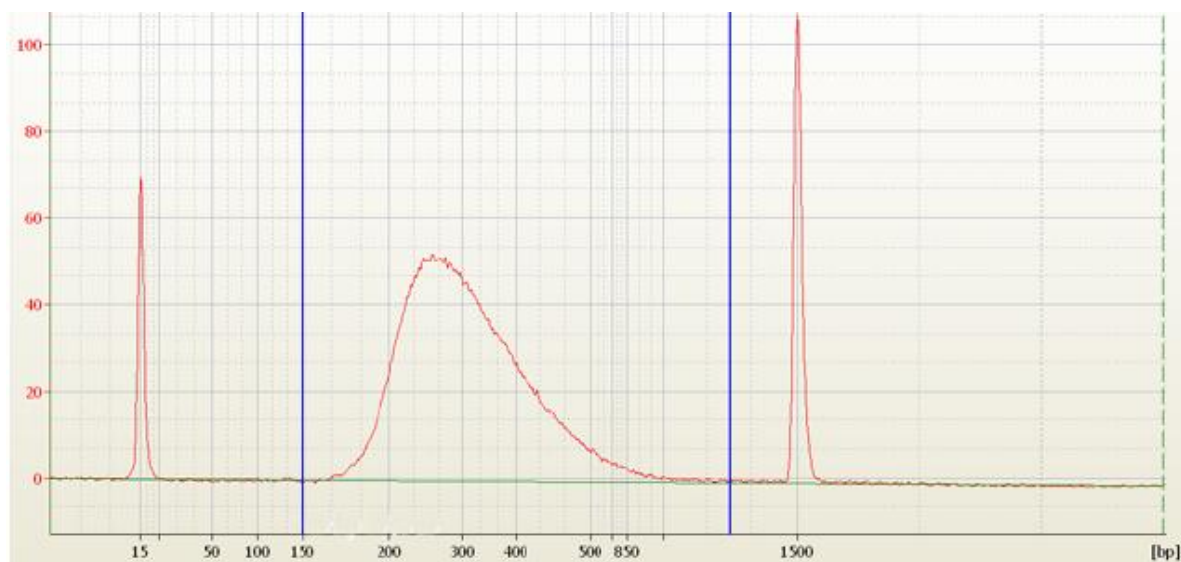


図 8 増幅されたアダプタ付き cDNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。

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 -20°C で保管することができます。

Option 2: Agilent 2200 TapeStation による品質チェック

TapeStation の D1000 ScreenTape (p/n 5067-5582)と専用試薬キット(p/n 5067-5583)を使います。

TapeStation の操作マニュアルは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

TapeStation による測定

1. 断片化した DNA サンプルが入ったプレートに PlateLoc Thermal Microplate Sealer でシールします。設定は、165°C、1.0 秒です。
2. プレートの各ウェルに入っている DNA サンプルをボルテックスでよく攪拌します。30 秒間遠心して壁やプレートシールについた液を落とします。
3. Agilent 2200 TapeStation の操作マニュアルに従い、1 μ L のアダプタ付き増幅 DNA 希釈サンプルを、3 μ L の D1000 サンプルバッファで希釈し、よく混ぜます。DNA サンプルと D1000 サンプルバッファは混ざりにくく、混ぜ方が不十分だと結果に悪影響を与えますので、十分に混ぜるように注意してください。

CAUTION 正確な定量のために、ボルテックスミキサ上で 5 秒間攪拌し、DNA と D1000 サンプルバッファが完全に混ざるようにして下さい。

4. サンプルプレートもしくはサンプルチューブストリップを TapeStation にセットし、ランをスタートさせます。
5. 結果をチェックします。図 9 の泳動図のような分布が得られ、およそ 200-600 bp の位置にあるピークを積分して、ライブラリの濃度 (ng/ μ L) を測定します。

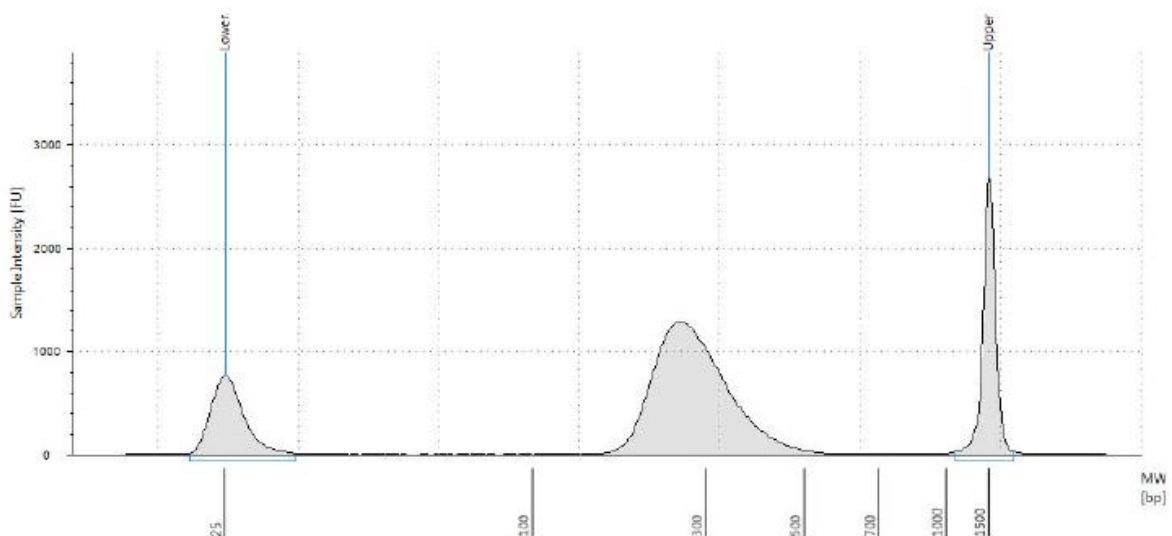


図 9 増幅されたアダプタ付き cDNA ライブラリの D1000 ScreenTape による泳動図

3. サンプル調製

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 -20°C で保管することができます。

STEP8. 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

シーケンシングレーン 1 つでマルチプレックスが可能なインデックス付きライブラリの総数は、使用するプラットフォームの出力性能と、ご自身の研究デザインにおいて解析に必要なシーケンシングデータの量によって決まります。RNA シーケンシングの目的によって必要なカバレッジは変わるため、必要なカバレッジと、使用するプラットフォームのキャパシティにしたがって、1 レーンに混合可能なインデックス数を検討してください。

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、インデックスバーコード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) : プール後の最終的な必要量

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バーコードタグの数

C(i) : 各インデックス付加サンプルの初期濃度

表 43 に 4 つのインデックスサンプル(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 20µL (10nM の濃度)にするには Low TE を用います。

表 43 トータル量 20µL 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整を行います。

- ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が 20 µL より少ない場合、Low TE Buffer を用いて総量が 20 µL 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 20 µL 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 20 µL とします。

3. サンプル調製

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。
4. 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ください。

ライブラリのプールのための希釈とプール方法は、フローセルのキャパシティと分析のパイプラインによって異なります。必ずイルミナ社の適切なプロトコルを参照ください。

STEP9. シーケンスサンプルの準備

アジレント社 R&D でのテストランにおいて、SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットで調製したライブラリで適切なクラスタ密度を得るには、Exome のキャプチャライブラリよりも高い濃度でクラスタ形成を行った方がよい、という結果が得られています。例えば、Exome のライブラリを 8-10pM の濃度で Seeding し、800-900K/mm² のクラスタ密度を得ている場合、SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットで調製したライブラリは 10-12pM 程度の濃度を用いています。本データを参照いただき、適切な濃度でクラスタ形成を行うようにしてください。

本プロトコルは 2x100 bp シーケンシングランでバリデーションされていますが、リード長は目的によって変更することができます。

8-bp index を用いた RNA Seq のシーケンシングランセットアップガイドライン

シーケンシングランを示す Cycles 設定を使用して 8-nt インデックスリードを行うよう設定してください。サイクル数設定は、装置コントロールソフトウェアインターフェイスのインデックスタイプ選択ボタンから Custom を選択した後、Run Configuration スクリーンで指定できます。

全 Index の塩基配列情報については、巻末のリファレンスを参照して下さい。

表 44 HiSeq プラットフォーム Run Configuration スクリーン Cycle Number 設定

Run Segment	Cycle Number
Read 1	100
Index 1 (i7)	9
Index 2 (i5)	0
Read 2	100

* 設定は v3.0 SBS ケミストリーに適用します。

3. サンプル調製

Sequencing Analysis Guideline

1. Demultiplex について

8 bp のインデックス配列を用いて、Demultiplex を行う際には、インデックス配列の 1 bp のミスマッチを許容する設定にしてください。

2. Strand 情報について

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製システムを用いた方法では、下記のように strand 情報が保存されます。

第一鎖 cDNA は、poly(A)RNA 転写産物の相補鎖です。第二鎖 cDNA は、PCR 前に除去されます。

そのため、シーケンス結果における Read1,2 それぞれの strand は下記の対応となります。

- Read1 (P5 側) は第一鎖 cDNA と一致
- Read2 (P7 側) は第二鎖 cDNA、poly(A)RNA strand と一致

データ解析で strand の方向性を決める際に、上記の情報を考慮ください。

例えば、Picard tools(<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を使って RNA シーケンスのメトリクスを計算する場合、正しく strand 特異性を計算するために下記のパラメーターを含めてください。

STRAND_SPECIFICITY= SECOND_READ_TRANSCRIPTION_STRAND

4. リファレンス

この章では、リファレンス情報について説明します。

CAUTION

以下のリファレンスは、新 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。旧来の 8 bp の長さのインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、P.86 から記載されている情報を参照してください。

新 8 bp のインデックスの見分け方

96 反应用は、5500-0135 のボックス中の青色 96 ウェルプレート中に入っています。

試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット (青色ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect^{XT} RNA 試薬キットは、4 °C 保存品、-20 °C 保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管してください。

また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うように注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 45 SureSelect^{XT} RNA キット (新 8 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Component Kits	Storage Condition	Part Number
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1	-20°C	5500-0135
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2	4°C	5190-6411

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

表 46 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, ILM Box1 (新 8 bp インデックス対応)
(-20℃保存)内訳

Kit Component	Details
RNA Seq Fragmentation Mix	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Enzyme Mix	bottle
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Oligo Mix	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-capture PCR Primer*	tube with green cap
SureSelect ^{XT} Indexes, 8 bp [†]	SureSelect 8 bp Indexes A01 through H12, provided in blue 96-well plate [‡]

* 本 Box に含まれる [SureSelect ILM Post-Capture PCR Primer](#) は本プロトコルに記載されている実験手順では使用しません。このプライマーは、SureSelect RNA Sequencing Target Enrichment Workflow(G9691-90000)で使します。

† 新 8 bp のインデックス部分のシーケンス配列については、表 48 を参照ください。

‡ RNA Seq Index のプレートマップは表 47 を参照して下さい。このプレートには 96 種類の RNA Seq Index が含まれますが、本プロトコルに記載されている mRNA シーケンス workflow では A01 から H06 までのインデックスだけを使用します。各 Index は、2 回分の RNA ライブラリ調製に十分な量のインデックスプライマーを含みます。

4. リファレンス

表 47 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #2 (4 °C保存)内訳

Kit Component	Details
Oligo(dT) Microparticles	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	bottle
Nuclease Free Water	bottle

**表 48 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #1 5500-0135 に含まれている
青色 96 ウェルプレートの新 8 bp インデックス A01-H06 までのマップ**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

表 49 新 8 bp インデックスの配列情報 (96 反応は青色プレート)

Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence
A01	ATGCCTAA	A04	AACTCACC	A07	ACGTATCA	A10	AATGTTGC
B01	GAATCTGA	B04	GCTAACGA	B07	GTCTGTCA	B10	TGAAGAGA
C01	AACGTGAT	C04	CAGATCTG	C07	CTAAGGTC	C10	AGATCGCA
D01	CACTTCGA	D04	ATCCTGTA	D07	CGACACAC	D10	AAGAGATC
E01	GCCAAGAC	E04	CTGTAGCC	E07	CCGTGAGA	E10	CAACCACA
F01	GACTAGTA	F04	GCTCGGTA	F07	GTGTTCTA	F10	TGGAACAA
G01	ATTGGCTC	G04	ACACGACC	G07	CAATGGAA	G10	CCTCTATC
H01	GATGAATC	H04	AGTCACTA	H07	AGCACCTC	H10	ACAGATTC
A02	AGCAGGAA	A05	AACGCTTA	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA	E06	ATTGAGGA	E09	AGATGTAC	E12	ACACAGAA
F03	GCGAGTAA	F06	GTCGTAGA	F09	TCTTCACA	F12	GAACAGGC
G03	ACTATGCA	G06	AGAGTCAA	G09	CCGAAGTA	G12	AACCGAGA
H03	CGGATTGC	H06	CCGACAAC	H09	CGCATACA	H12	ACAAGCTA

CAUTION

以下のリファレンスは、旧来の 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。新 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、P82 から記載されている情報を参照してください。

旧来の 8 bp のインデックスの見分け方

96 反应用は、5500-0117 のボックス中の透明 96 ウェルプレート中に入っています。

試薬一覧 旧来の 8 bp のインデックスが入った試薬キット (透明ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect^{XT} RNA 試薬キットは、4 °C 保存品、-20 °C 保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管してください。

また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うように注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 50 SureSelect^{XT} RNA キット (旧来の 8 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Component Kits	Storage Condition	Part Number
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1	-20°C	5500-0117
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2	4°C	5190-6411

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

表 51 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, ILM Box1 (旧来の 8 bp インデックス対応) (-20℃保存)内訳

Kit Component	Details
RNA Seq Fragmentation Mix	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap
RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix	bottle
RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-capture PCR Primer [*]	tube with green cap
RNA Seq Indexes, 8 bp [†]	RNA Seq Indexes 1-96, 8 bp provided in clear 96-well plate [‡]

* 本 Box に含まれる [SureSelect ILM Post-Capture PCR Primer](#) は本プロトコルに記載されている実験手順では使用しません。このプライマーは、SureSelect RNA Sequencing Target Enrichment Workflow(G9691-90000)で使します。

† 旧来の 8 bp のインデックス部分のシーケンス配列については、表 53 を参照ください。

‡ RNA Seq Index のプレートマップは表 52 を参照して下さい。このプレートには 96 種類の RNA Seq Index が含まれますが、本プロトコルに記載されている mRNA シーケンス workflow では 1 から 48 までのインデックスだけを使用します。各 Index は、2 回分の RNA ライブラリ調製に十分な量のインデックスプライマーを含みます。

4. リファレンス

表 52 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #2 (4 °C保存)内訳

Kit Component	Details
Oligo(dT) Microparticles	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	bottle
Nuclease Free Water	bottle

表 53 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #1 5500-0117 に含まれている透明 96 ウェルプレートの旧来の 8 bp インデックス 1-48 までのマップ

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

表 54 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (96 反応は透明プレート)

Index Number	Sequence
1	AACGTGAT
2	AAACATCG
3	ATGCCTAA
4	AGTGGTCA
5	ACCACTGT
6	ACATTGGC
7	CAGATCTG
8	CATCAAGT
9	CGCTGATC
10	ACAAGCTA
11	CTGTAGCC
12	AGTACAAG
13	AACAACCA
14	AACCGAGA
15	AACGCTTA
16	AAGACGGA

4. リファレンス

Index Number	Sequence
17	AAGGTACA
18	ACACAGAA
19	ACAGCAGA
20	ACCTCCAA
21	ACGCTCGA
22	ACGTATCA
23	ACTATGCA
24	AGAGTCAA
25	AGATCGCA
26	AGCAGGAA
27	AGTCACTA
28	ATCCTGTA
29	ATTGAGGA
30	CAACCACA
31	CAAGACTA
32	CAATGGAA

Index Number	Sequence
33	CACTTCGA
34	CAGCGTTA
35	CATACCAA
36	CCAGTTCA
37	CCGAAGTA
38	CCGTGAGA
39	CCTCCTGA
40	CGAACTTA
41	CGACTGGA
42	CGCATACA
43	CTCAATGA
44	CTGAGCCA
45	CTGGCATA
46	GAATCTGA
47	GACTAGTA
48	GAGCTGAA

自動化プロトコルで使用するプラスチックプレート類の数

以下の表は、各自動化プロトコルのランで必要になる、各種プラスチックプレートを示しています。この表では、他のプロトコルやランセットで使用されるプレート類については、最初に使用されるステップでのみ記載されています。例えば、Nunc DeepWell マスターミックスプレートは複数のプロトコルで使用されますが、最初に必要になるステップでのみ、表記されています。

mRNA_Purification_v1.0.pro	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	2	3	4	4	6	10
Empty tip boxes (for waste tips)	2	2	2	2	2	2
Nunc DeepWell Plates	2	2	2	2	2	2
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates	3	3	3	3	3	3
PCR plates (compatible with thermal cycler)	4	4	4	4	4	4
Thermo Scientific Reservoirs						
Axygen square-well plate (waste)	1	1	1	1	1	1
Corning 3344 General Assay Plate	3	3	3	3	3	3

AMPureXP_v1.0.pro:First Strand	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	1	1	2	2	3	6
Empty tip boxes (for waste tips)	1	1	1	1	1	1
Nunc DeepWell Plates	1	1	1	1	1	1
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates	1	1	1	1	1	1
PCR plates (compatible with thermal cycler)						
Thermo Scientific Reservoirs	2	2	2	2	2	2
Axygen square-well plate (waste)	1	1	1	1	1	1
Corning 3344 General Assay Plate	1	1	1	1	1	1

LibraryPrep_RNASeq_ILM_v1.1.rst	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	2	3	4	5	7	14
Empty tip boxes (for waste tips)	1	1	1	1	1	1
Nunc DeepWell Plates	1	1	1	1	1	1
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates	4	4	4	4	4	4
PCR plates (compatible with thermal cycler)						
Thermo Scientific Reservoirs	2	2	2	2	2	2
Axygen square-well plate (waste)	1	1	1	1	1	1
Corning 3344 General Assay Plate	2	2	2	2	2	2

TranscriptomePCR_ILM_v1.0.pro	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	2	2	2	2	2	2
Empty tip boxes (for waste tips)	2	2	2	2	2	2
Nunc DeepWell Plates						
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates						
PCR plates (compatible with thermal cycler)	1	1	1	1	1	1
Thermo Scientific Reservoirs						
Axygen square-well plate (waste)						
Corning 3344 General Assay Plate						

4. リファレンス

AMPureXP_v1.0.pro:Transcriptome PCR	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	1	1	2	2	3	6
Empty tip boxes (for waste tips)	1	1	1	1	1	1
Nunc DeepWell Plates	2	2	2	2	2	2
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates	1	1	1	1	1	1
PCR plates (compatible with thermal cycler)						
Thermo Scientific Reservoirs	2	2	2	2	2	2
Axygen square-well plate (waste)	1	1	1	1	1	1
Corning 3344 General Assay Plate						

AMPureXP_v1.0.pro:Transcriptome Dimers	1 カラム ラン	2 カラム ラン	3 カラム ラン	4 カラム ラン	6 カラム ラン	12 カラム ラン
Tip boxes (filled)	1	1	2	2	3	6
Empty tip boxes (for waste tips)	1	1	1	1	1	1
Nunc DeepWell Plates	0	0	0	0	0	0
96 Eppendorf twin.tec full-skirt plates	1	1	1	1	1	1
PCR plates (compatible with thermal cycler)						
Thermo Scientific Reservoirs						
Axygen square-well plate (waste)						
Corning 3344 General Assay Plate	1	1	1	1	1	1

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^{XT} 自動化システム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^{XT} 自動化システム(もしくはXT-Auto)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。**