

アジレント SureSelect

Strand-Specific RNA

ライブラリ調製

イルミナマルチプレックス

シーケンス対応

mRNA ライブラリ調製プロトコル

和文プロトコル

Protocol Version C.0, 対応

[2014年12月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した

SureSelect プラットフォーム

Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.



Agilent Technologies

1. はじめに

本プロトコルについて

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

本日本語プロトコルは、英語版の
Protocol
SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep
for Illumina Multiplexed Sequencing
Version C.0, December, 2014
G9691-90010

に対応しています。

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 G9691-90000 に対応する和文プロトコルをご覧ください。

本プロトコルに関するご質問やご意見などございましたら、下記のメールアドレスにご連絡ください。

email_japan@agilent.com

1. はじめに

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

2. サンプル調製

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。

3. リファレンス

この章では、キットの構成や Index の配列等、付加的な情報について説明しています。

1. はじめに

これまでのバージョンでの変更点

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白色キャップのチューブ(16反応キット 5500-0134)、もしくは青色プレート(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H02(16反応キット)またはA01からH12(96反応キット)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キャップのチューブ(16反応キット 5500-0116)、もしくは透明なプレート(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16(16反応キット)または1から96(96反応キット)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。

Version B.0 での変更点

- 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 B.0 は新しいBOX1に対応しております。(Step5, p19)

- Step4の溶出量に変更になりました。(STEP4, p18)
- Low TE バッファのサプライヤ情報を更新しました。(表1, p8)
- Sequence Analysis Guidelineを追加しました。(p33)

目次

1. はじめに 6

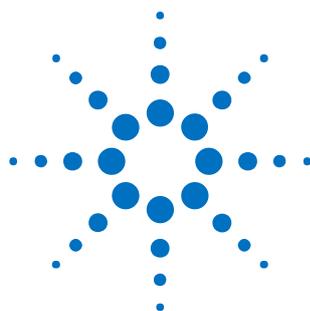
- 操作に関する注意 7
- 安全に関する注意 7
- 実験に必要な試薬 8
- 実験に必要な装置、消耗品類 9

2. サンプルの調製 10

- STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製 12
- STEP2. Poly(A) RNA の断片化 15
- STEP3. 第一鎖 cDNA の合成 16
- STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製 18
- STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復 20
- STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製 21
- STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化 22
- STEP8. アダプタライゲーション 23
- STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製 24
- STEP10. アダプタ付き cDNA ライブラリのインデックス付加と増幅 25
- STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製 28
- STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルの分析 29
- STEP13. AMPure XP ビーズによるアダプタダイマーの除去 (オプション) 31
- STEP14. 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 32
- STEP15 シーケンスサンプルの準備 34

5. リファレンス 36

- 試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット 37
(白色キャップチューブもしくは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)
- 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 41
(透明キャップチューブもしくは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)



1. はじめに

操作に関する注意 7

安全に関する注意 7

実験に必要な試薬 8

実験に必要な装置、消耗品類 9

最新のプロトコルを参照ください。 [Agilentgenomics.jp](https://www.agilentgenomics.jp) の[サポート（実験に必要な情報等）]にジャンプし、[\[お客様専用サポートサイト\]](#)にログインして和文資料をご覧ください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

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。



操作に関する注意

- ・ 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- ・ RNA 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。
- ・ 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ください。
- ・ Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

安全に関する注意

CAUTION

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

実験に必要な試薬

・下記の表は以下の 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。

・この必要なものリストは、total RNA から poly(A)RNA を精製し、全 poly(A) RNA を Sequencing するためのライブラリ調製に必要な試薬と器具類をまとめたものです。シーケンシングに必要な物は、イルミナ社にお問い合わせください。

表 1 実験に必要な試薬

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量/ 1反応 あたり	内容量	備考
SureSelect 試薬キット						
SureSelect Strand Specific RNA Library 調製試薬, イルミナ対応, 16反応	Agilent	G9691A	指定	1	16反応分	マニュアル・自動化対応 ライブラリ調製試薬 16反応分
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	316 uL	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400 uL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	1400 uL	500 mL	98%以上、分子生物学グレード、(ほかの有機 溶剤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						
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		
Agilent TapeStation 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。
Agilent TapeStation 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。
Agilent TapeStation 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。
Agilent TapeStation 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。スタート時のRNAの分解度評価 にご使用できます。
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。スタート時のRNAの分解度評価 にご使用できます。

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

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

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

※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

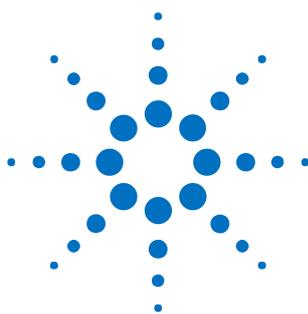
下記の表は以下の WEB-site から pdf ファイルをダウンロードいただくことができます。

<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

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量	備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。					
Agilent 2200 TapeStation System	Agilent	G2964AAまたは G2965AA	指定		RNA、DNAの定量とサイズ確認に必要です。
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.02.07以降のversionであること
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当		HotTopが使用できること
96 well plate module for SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8810A	相当		
96 Well Polypropylene Plate	Agilent	410088	相当		25 plates
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	相当		strip caps 120本
Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート用) または日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	Life Technologies(ペ リタス) または 日本ジェネティ クス	120-27 (96ウェルプレート 用)、 FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	相当		96 well plate用の磁石スタンド、Phenix Research Products (RX-IMAG- 96P)など相当品でも可能
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		
遠心分離機ローター	Eppendorf	022636006	相当		
Tube-strip capping tool			相当		PCRチューブのキャップを確実に密閉する ために便利なツールです。
Nuclease Free 1.5 mL microfuge tubes	Life Technologies	AM12400	相当	500本	核酸の吸着が少なく、且つNuclease Freeであるもの
Nuclease Free 0.2 mL PCRチューブ (thin-walled)	Eppendorf	95262-0030 124.332	相当	1000本	
ピペット	Pipetman	P10, P20, P200, P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		SureSelectのハイブリダイゼーションを多検 体に対して同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease- Free、エアロゾルブロックフィルター付き					
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当		
アイスパケツ					
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 スピンドアウンが可能なもの
卓上遠心器	日本ミリオア	チビタンII	相当		



2. サンプルの調製

- STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製 12
- STEP2. Poly(A) RNA の断片化 15
- STEP3. 第一鎖 cDNA の合成 16
- STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製 18
- STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復 20
- STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製 21
- STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化 22
- STEP8. アダプタライゲーション 23
- STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製 24
- STEP10. アダプタ付き cDNA ライブラリのインデックス付加と増幅 25
- STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製 28
- STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルの分析 29
- STEP13. AMPure XP ビーズによるアダプタダイマーの除去 (オプション) 31
- STEP14. 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 32
- STEP15. シーケンスサンプルの準備 34

この章では、イルミナプラットフォームに対応した Strand-Specific RNA シーケンシングのための cDNA ライブラリ調製法を説明します。

SureSelect mRNA シーケンシングのサンプル調製ワークフローの概要を図 1 に示します。

ライブラリ調製を始める前に、固体のアクチノマイシン D を DMSO で 4 ug/uL のストック溶液に調製します。このアクチノマイシン D DMSO ストック溶液は、-20°C、遮光保存で、1 ヶ月間までであれば溶解して次の実験に使用できます。ライブラリ調製の過程でこの DMSO ストック溶液を水で希釈して使用します(用時調製)。使用時のアクチノマイシン D の終濃度は 120 ng/uL になります。(p16 参照)

2. サンプルの調製

SureSelect RNA Whole-Transcriptome NGS Workflow

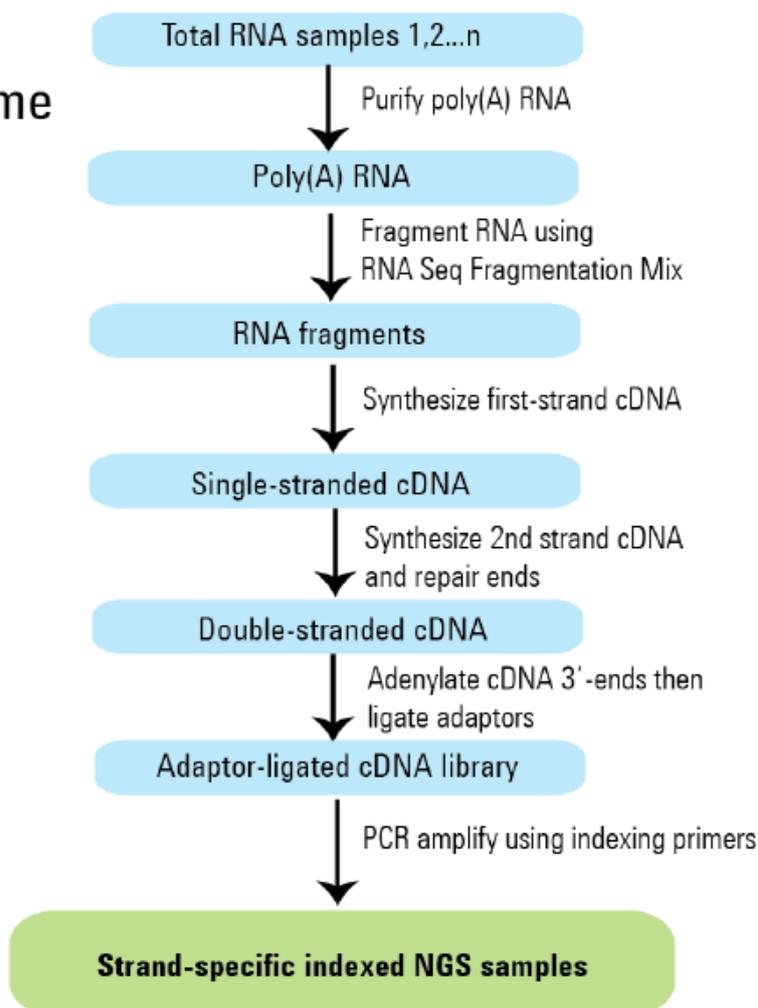


図 1 RNA シーケンシングのサンプル調製ワークフロー概要

STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製

このステップでは、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。

以下のステップを開始する前に、total RNA を準備して下さい。ライブラリ調製に必要な total RNA 量は 50 ng から 4 ug です。

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。

表 3 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	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 12
RNA Seq Bead Washing Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 13
RNA Seq Bead Elution Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 13
RNA Seq Bead Binding Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 14
RNA Seq Fragmentation Mix	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1 (-20°C保存)	P. 15

1. Total RNA サンプルを nuclease-free 水で 25 uL の容量に調整し、96 ウェルプレートのそれぞれのウェルに入れます。
2. 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、ピペティングで均一になるまで懸濁します。
3. 25 uL の均一な Oligo(dT) Microparticle 懸濁液を、96 ウェルプレートの各ウェルに入った Total RNA サンプルに加えます。
4. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、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。

2. サンプルの調製

5. サーマルサイクラにプレートセットし、以下表のプログラムを実行することで Total RNA を変性させます。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。

表 4 RNA 変性のサーマル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	4°C	Hold

6. サーマルサイクラが 4°C のホールドステップになったら、プレートを取り出して室温で 5 分インキュベーションします。この間に poly(A) RNA がオリゴ(dT)ビーズに結合します。
7. 室温のままプレートを磁石スタンドに移し、溶液が透明になるまで待ちます(約 2-5 分かかります)。
8. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
9. 磁石スタンドからプレートを取り出し、200 uL の RNA Seq Bead Washing Buffer をそれぞれのウェルに静かに加えます。
10. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、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。

CAUTION

RNA Seq Bead Washing Buffer は界面活性剤を含みます。ビーズと Wash buffer を混合する際、気泡を作らないように注意して下さい。Wash の過程で気泡が出来た場合、遠心器でスピンドウンしてから先に進んでください。

11. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
12. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
13. 磁石スタンドからプレートを取り出し、25 uL の RNA Seq Bead Elution Buffer をそれぞれのウェルに加えます。
14. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。

15. サーマルサイクラにプレートを設定し、以下表の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。

表 5 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

16. サーマルサイクラが 4°Cのホールドステップに達したらプレートをサーマルサイクラから取り出し、25 uL の RNA Seq Bead Binding Buffer をそれぞれのサンプルウェルに入れます。
17. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
18. プレートを室温で 5 分間インキュベーションし、poly(A) RNA を再度ビーズに結合させます。
19. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
20. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
21. 磁石スタンドからプレートを取り出し、200 uL の RNA Seq Bead Washing Buffer をそれぞれのウェルに静かに加えます。
22. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、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。
23. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
24. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
25. すぐに STEP2. Poly(A) RNA の断片化 に進みます。ここで実験を止めることは出来ません。

2. サンプルの調製

STEP2. Poly(A) RNA の断片化

このステップでは、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、化学的に断片化します。

1. Poly(A) RNA が結合したビーズが入ったプレートをも、磁石スタンドから取り出します。19 uL の RNA Seq Fragmentation Mix をそれぞれのサンプルウェルに加えます。
2. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
3. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表の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。

表 6 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

4. 94°Cで 8 分間インキュベートしている間に、p. 16 のステップ1、ステップ 2 を終わらせておきます。

STEP3. 第一鎖 cDNA の合成

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。氷上で RNA Seq First Strand Master Mix を溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

サンプルと酵素ミックスは、次の準備ステップの作業中は氷上に置いておきます。

CAUTION

ストランド特異性を保つために、次のステップ 1 で 120 ng/uL のアクチノマイシン D 溶液を、使用する直前に調製します。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。

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。

1. 以下表に従い、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 nuclease-free 水で 120 ng/uL に希釈します。

表 7 120 ng/uL アクチノマイシン D 溶液の調製

Reagent	Volume for up to 96-reaction run (includes excess)
Actinomycin D (4 µg/µl in DMSO)	3 µL
Nuclease-free water	97 µL
Total	100 µL

2. 以下表に従い、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で混合します。

表 8 First Strand Master Mix とアクチノマイシン D の混合液

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Actinomycin D (120 ng/µl in H ₂ O)	0.5 µL	8.5 µL
RNA Seq First Strand Master Mix	8.0 µL	136 µL
Total	8.5 µL	144.5 µL

2. サンプルの調製

- 断片化された RNA とビーズの入ったプレートをサーマルサイクラから取り出し、磁石スタンドに置きます。磁石スタンド上に置いたまま、室温で 5 分以上静置します。
- RNA サンプルプレートを室温で磁石スタンドに置いたまま、上澄み液 17 μ L を別の新しいウェルに移します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。RNA サンプルを含む上澄み液を回収したプレートは、氷上かコールドブロック上で保管します。
- RNA サンプルを回収した氷上のウェルに、上のステップ 2 で準備した **RNA Seq First Strand Master Mix/アクチノマイシン D 混合液** を 8.5 μ L ずつ加えます。
- 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合します。
- プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
- サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表の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。

表 9 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

- このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。70%エタノールを必要量調製します。

NOTE

同じ日に行う AMPure XP ビーズ精製ステップで使用する 70%エタノールを、この時点でまとめて調製することが出来ます。SureSelect RNA ライブラリ調製プロトコルの”サンプルの調製”の過程を最初から最後まで一日で実行する場合、STEP14 のオプションを含めてサンプルあたり 2.0 mL の用時調製された 70%エタノールが必要となります。ピペットロスや調製時の誤差を考慮し、余剰分を含めて調製して下さい。

STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. サンプルあたり 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 46 uL を、PCR プレート中のサンプル 25.5 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、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。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後 70%エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 2 回目の Wash の 70%エタノール 200 uL を取り除いた後、プレートをスピンドウンし、磁石スタンドにプレートを戻します。残存しているエタノールの液滴があればピペットで取り除きます。
12. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
13. 21 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
14. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、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。
15. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
16. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
17. 上澄み液 約 20 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

2. サンプルの調製

18. すぐに次ページの STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復に進みます。

STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復

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。氷上で RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix と RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix を溶解し、使用するまで氷上で保管します。使用前に 5 秒間ボルテックスしてください。

サンプルと試薬は、次の準備ステップの作業中は氷上に置いておきます。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットの試薬は粘性が高いため、使用前に溶解した後、チューブをボルテックスでよく攪拌し、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。**試薬を加える順番を変更しないでください。**

1. 25 uL の RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix を、20 uL の精製された第一鎖 cDNA サンプルに加えます。
2. 5 uL の RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix を上記の各ウェルに加えます。各ウェルの全量は 50uL になります。
3. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
4. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
5. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないで下さい。**

表 10 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

6. このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。

2. サンプルの調製

STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. サンプルあたり 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、PCR プレート中のサンプル 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、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。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後 70%エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 21 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、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。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
上澄み液 約 20 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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 1 ヶ月まで保管することができます。

STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化

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。氷上で [RNA Seq dA Tailing Master Mix](#) を溶解して混合し、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。

1. 20 uL の [RNA Seq dA Tailing Master Mix](#) を、20 uL の末端修復後精製された cDNA サンプルに加えます。
2. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
3. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
4. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないで下さい。**

表 11 dA Tailing のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

2. サンプルの調製

STEP8. アダプタライゲーション

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。氷上で [SureSelect Ligation Master Mix](#) と [SureSelect Oligo Adaptor Mix](#) を溶解して混合し、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。

1. cDNA サンプルが入ったプレートを氷上に移し、5 uL の [SureSelect Ligation Master Mix](#) を A 付加された cDNA サンプル 40 uL に加えます。ピペティングでよく混合します。
2. 5uL の [SureSelect Oligo Adaptor Mix](#) を各サンプル 45 uL に加えます。
3. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
4. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
5. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。サーマルサイクラの **Hot Top** は使用しないで下さい。

表 12 アダプタライゲーションのサーマルサイクラプログラム

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

7. このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。

STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. サンプルあたり 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60 uL を、PCR プレート中のサンプル 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、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。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後 70%エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 18 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、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。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 3 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 17 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

2. サンプルの調製

STEP10. 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、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。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。

NOTE

このプロトコルに記載の PCR 条件は、ターゲットエンリッチメントを行わずに mRNA ライブラリを作製する場合に最適化されています。ライブラリ調製に続いてターゲットエンリッチメントを行う場合は、別途専用のプロトコルをご参照ください。

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 13 と表 14 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。

1. 以下表に従って、[RNA Seq ILM Reverse PCR Primer](#) を 1:20 に希釈します。

表 13 リバースプライマーの希釈

Reagent	Volume for up to 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	19 μ L
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	1 μ L
Total	20 μL

2. 以下表に従って氷上で PCR 反応ミックスを調製し、ボルテックスでよく混合します。

表 14 PCR 反応ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
RNA Seq PCR Master Mix	25 μ L	425 μ L
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1 μ L	17 μ L
SureSelect Primer (forward primer)	1 μ L	17 μ L
1:20 dilution of RNA Seq ILM Reverse PCR Primer prepared in Table 13	1 μ L	17 μ L
Total	28 μL	476 μL

3. ステップ 2 で調製した PCR 反応ミックス 28 uL を、17 uL の精製されたアダプタ付き cDNA サンプルに加えます。ピペティングでよく混合します。異なるサンプルのピペティングを行う際はチップを新しいものに交換して下さい。
4. 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) をそれぞれの PCR 反応ミックスのウェルに加えます。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。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)**

16 反応では、5500-0134 のキットの中の白色キャップのチューブ中に入っています。

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 (1-96)

16 反応では、5500-0116 のキットの中の透明キャップのチューブ中に入っています。

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。

2. サンプルの調製

5. サーマルサイクラにプレートを設定し、以下表のプログラムを実行します。Hot Top を使用します。

表 15 mRNA シーケンス用インデックス 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 16)	95°C	30 seconds
		65°C	30 seconds
		72°C	1 minute
4	1	72°C	5 minutes
5	1	4°C	Hold

表 16 mRNA シーケンス用インデックス PCR のサイクル数の推奨

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(表 16 参照)。

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便利です。

STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
3. サンプルあたり 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60 uL を、プレート中の PCR 産物 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、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。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後 70%エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 26 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、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。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 25 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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。

STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルの分析**NOTE**

代わりに [D1000 ScreenTape \(Agilent p/n 5067-5582\)](#) と [D1000 Reagents \(Agilent p/n 5067-5583\)](#) を使用する方法を選択することもできます。詳細は *Agilent 2200 TapeStation User Manual* を参照してください。

精製、増幅したアダプタ付き cDNA ライブラリのサイズと濃度をバイオアナライザ DNA1000 アッセイを用いて測定します。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 μ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。
 - ① 以下の泳動図のように、約 200 bp-600 bp の位置にスミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。正確に定量するために、サンプルの濃度が DNA 1000 アッセイの直線範囲内にあることを確認して下さい。
 - ② 泳動図の 100-150 bp の範囲を確認して下さい。この領域にピークが見られる場合、cDNA サンプル中にアダプタダイマーが存在している可能性があります。アダプタダイマーは最善のシーケンス結果のためには除去する必要があります。

アダプタダイマーが見られた場合、nuclease-free 水でサンプルを 50 μ L にボリュームアップし、p.31 の STEP13. アダプタダイマーの除去(オプション) を実施して下さい。

アダプタダイマーが見られなければ、p.32 の STEP14. 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 に進んでください。

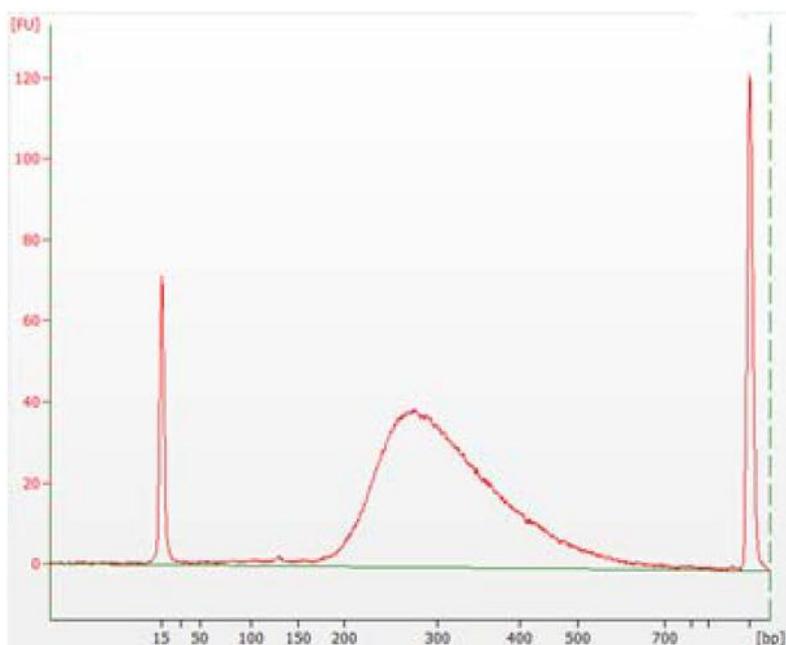


図 2 DNA 1000 キットを用いた増幅後の cDNA ライブラリの泳動図。200 から 600 bp の間にシングルピークが見られることを確認して下さい。

2. サンプルの調製

STEP13. AMPure XP ビーズによるアダプタダイマーの除去 (オプション)

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
3. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60 uL を、プレート中のサンプル 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、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。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後 70%エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 26 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、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。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 25 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

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。

2. サンプルの調製

STEP14. 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、インデックス付加サンプルをプールするための量を計算します。

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

V(f) : プール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 17 に 4 つのインデックス付加サンプル(それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。最終的な量 20 μ L (10 nM の濃度)にするには 1x Low TE Buffer を用います。

表 17 トータル量 20 μ L 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 (μ L)
Sample 1	20 μ L	20 nM	10 nM	4	2.5
Sample 2	20 μ L	10 nM	10 nM	4	5
Sample 3	20 μ L	17 nM	10 nM	4	2.9
Sample 4	20 μ L	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

2. 最終的に必要な濃度になるように、最終的な液量の調整を行います。
 - ・ プールしたインデックス付加サンプル量の総量が必要な量より少ない場合、1x Low TE Buffer を用いて総量を調整します。
 - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が必要な量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して必要な量に調整します。
3. 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween20 を 0.1% (v/v)の濃度になるよ

うに加えて-20°C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。

2. サンプルの調製

STEP15 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 2 x 100 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 インデックスタグ付加 RNA Seq のため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以下表に示す 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。

表 18 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 ケミストリーの場合

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。

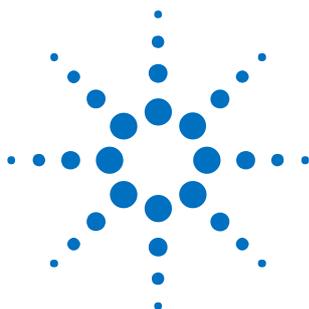
そのため、シーケンス結果における Read1,2 それぞれの strand は下記の対応となります。

- ・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 シークエ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`



5. リファレンス

試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット	37
新 8 bp インデックスのマップ	39
新 8 bp インデックスの塩基配列	40
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	41
旧来の 8 bp インデックスのマップ	43
旧来の 8 bp インデックスの塩基配列	44

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.41 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

16 反应用は、5500-0134 のボックス中の白色キャップのチューブに入っています。

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

試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット (白色キャップチューブもしくは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ご注意ください。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 19 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	16 Samples	96 Samples
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1	-20°C	5500-0134	5500-0135
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2	4°C	5190-6410	5190-6411

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

2. サンプルの調製

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

Kit Component	16 Reactions (p/n 5500-0134)	96 Reactions (p/n 5500-0135)
RNA Seq Fragmentation Mix	tube with red cap	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Enzyme Mix	tube with blue cap	bottle
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Oligo Mix	tube with yellow cap	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	tube with green cap	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	tube with red cap	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-capture PCR Primer*	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect ^{XT} Indexes, 8 bp [†]	SSEL 8bp Indexes A01 through H02, provided in 16 tubes with white caps	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 23 を参照ください。

‡ RNA Seq Index のプレートマップは表 22 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。

表 21 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #2 (4 °C保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
Oligo(dT) Microparticles	tube with brown cap	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	tube with purple cap	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	tube with green cap	bottle
Nuclease Free Water	bottle	bottle

表 22 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

2. サンプルの調製

表 23 新 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は白色キャップのチューブ A01-H02、
96 反応は青色プレート A01-H06)

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	TGGTG GTA
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、P37 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

16 反应用は、5500-0116 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

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

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 (透明キャップチューブもしくは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 24 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	16 Samples	96 Samples
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1	-20°C	5500-0116	5500-0117
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2	4°C	5190-6410	5190-6411

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

2. サンプルの調製

表 25 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, ILM Box1 (旧来の 8 bp インデックス対応)
(-20°C保存)内訳

Kit Component	16 Samples	96 Samples
RNA Seq Fragmentation Mix	tube with red cap	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Enzyme Mix	tube with blue cap	bottle
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Oligo Mix	tube with yellow cap	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	tube with green cap	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	tube with red cap	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-capture PCR Primer*	tube with green cap	tube with green cap
RNA Seq Indexes, 8 bp	RNA Seq Indexes 1-16, 8 bp provided in 16 tubes with clear caps	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)で使用します。

† 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 28 を参照ください。

‡ RNA Seq Index のプレートマップは表 27 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。

表 26 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #2 (4 °C保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
Oligo(dT) Microparticles	tube with brown cap	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	tube with purple cap	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	tube with green cap	bottle
Nuclease Free Water	bottle	bottle

表 27 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

2. サンプルの調製

表 28 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、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

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

2. サンプルの調製

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

Copyright Agilent Technologies 2014

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

本和文プロトコルの著作権は全て 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。万が一不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

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

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

分析結果に基づく損失

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

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

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

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

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

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。

* 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。

