

アジレント

SureSelect XT **HS2 mRNA**

ライブラリ調製システム

PolyA 選択及び Strand-Specific

RNA ライブラリ調製

イルミナペアエンドマルチプレックス

シーケンス対応キット

和文プロトコル

Protocol Version B0, June 2022 対応

[2022年7月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した

SureSelect プラットフォーム

Research Use Only.

Not for use in Diagnostic Procedures.

1. はじめに

通知

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2022

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

確認

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

保証

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

技術ライセンス

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

制限付き権利の説明文

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

ご購入者への通知

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

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

CAUTION

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

WARNING

WARNING 表示は危険性を示します。正しく実行または遵守されなかった場合に、事故や重大な怪我につながる可能性のある操作手順や方法などを示しています。WARNING 表示の個所は、その条件を完全に理解し満たすまで、その先に進まないでください。

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

SureSelect XT HS2 mRNA Library Preparation System

Poly-A Selection and Strand-Specific mRNA Seq Library Preparation for the Illumina Platform

Version B0, June 2022 [G9995-90000] に対応しています。

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

email_japan@agilent.com

Version B0 の追加項目

- 24 反応分の液量を更新（表 15、表 17、表 26）
- お客様からのフィードバックで、AMPure XP ビーズの精製手順に新しいパラメータを含め更新（表 13、表 19、表 20、表 27）
- AGeNT v3.0 の LocatIt tool に代わり新しい CReaK tool や BCL Convert ソフトウェアを使用する MBC トリミングの説明など、シーケンシング後の情報を更新
- SureSelect XT HS2 Index Primer Pair の情報を P5 インデックスの配列方向を明瞭に記載

Version A1 の追加項目

- シーケンサプラットフォームごとの P5 インデックスの追加とインデックスペアの配列を更新し、ウェル位置を修正
- シーケンシングのサポート情報を更新

本資料は、イルミナ社のペアエンドマルチプレックス mRNA シーケンシングライブラリを作製するためのプロトコルです。

1. はじめに

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

2. インプット RNA の断片化と cDNA 化

この章では、total RNA サンプル中の poly-A mRNA をエンリッチし、断片化を行った後に、cDNA に変換するステップを説明しています。

3. ライブラリ調製

この章では、デュアルインデックスと分子バーコードを含む cDNA シーケンスライブラリを調製する手順について説明しています。

4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプル調製

この章では、シーケンスするサンプル調製とイルミナ社の NGS プラットフォームの設定のガイドラインについて説明しています。

5. リファレンス

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

1. はじめに

内容

1. はじめに	7
ワークフロー概要	8
操作に関する注意点	9
安全に関する注意	9
実験に必要な試薬・器具	10
オプションの消耗品	13
2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成	14
Step 1. total RNA の準備と質の評価	16
Step 2. total RNA からのポリ A 選択	18
Step 3. mRNA サンプルの断片化	21
Step 4. 1 st ストランド cDNA 合成	22
Step 5. Second strand cDNA 合成	23
Step 6. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製	24
3. ライブラリ調製	26
Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製	28
Step 2. cDNA3'末端の修復と dA 付加	29
Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション	31
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製	32
Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅	35
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製	38
Step 7. ライブラリの定量と質の評価	40
4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン	42
Step 1. 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	43
Step 2. シーケンスサンプルの準備	45
Step 3. シーケンスの開始とデータ解析	47
5. リファレンス	53
キット内容	54
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報	56
インデックスプライマーペアのストリップチューブとプレートマップ	65
トラブルシューティングガイド	68
Quick Reference Protocol	70



1. はじめに

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

実験を始める前に、この章の内容を確認し必要な機器や試薬をご準備ください。

NOTE

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

1. はじめに

ワークフロー概要

SureSelect XT HS2 mRNA の NGS ライブラリ調製のワークフローを [図 1](#) に示します。

SureSelect XT HS2 mRNA Library Preparation for NGS Workflow

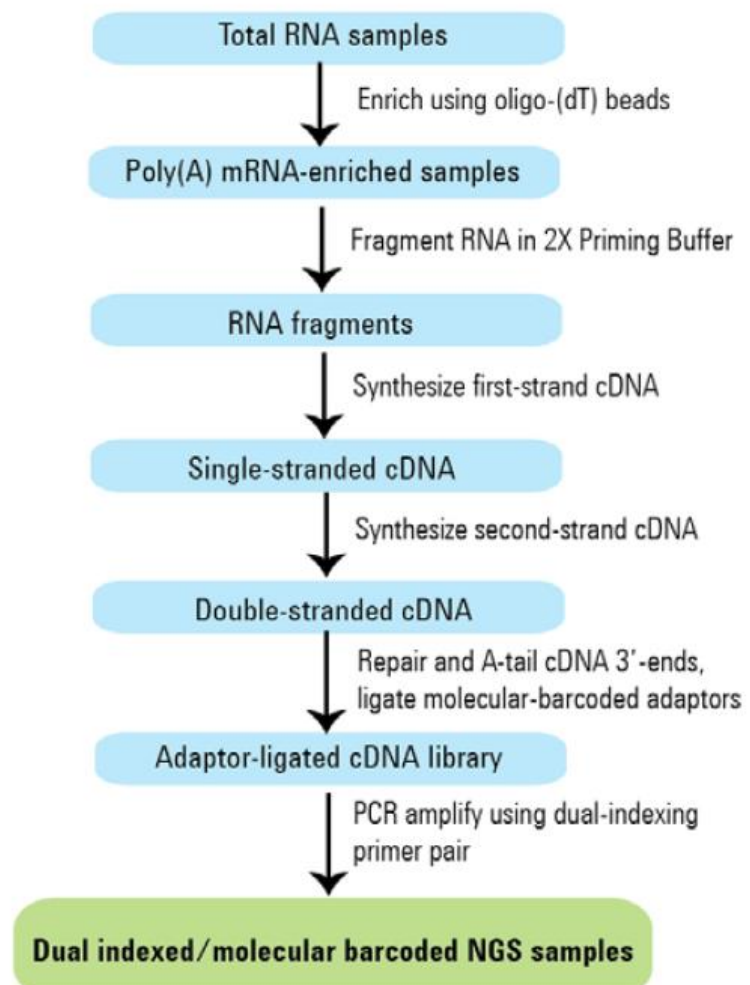


図 1 mRNA シーケンスサンプル調製のワークフロー

操作に関する注意点

- ・ ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- ・ 実験過程全体を通して、サンプル間での PCR 産物や RNase のコンタミネーションを防ぐため、以下を実施することをお勧めします。
 1. PCR 前のサンプルを扱う場所と PCR 後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用してください。特に、PCR 後のエリアで使用するものを PCR 前の過程で使用するのは避けて下さい。
 2. 実験スペースは常にクリーンな状態にしてください。日常的にコンタミネーションのリスクがある場所を 10% bleach solution やその相当品により清潔に保ってください。
 3. PCR 前のエリアで試薬を使用するときは、常にヌクレアーゼフリーのエアロゾル防止フィルタ付きのピペットチップのついた専用のピペットを使用してください。
 4. パウダーフリーの手袋を着用してください。コンタミの可能性のあるものの表面に触れた後は必ず手袋を変えるなど、ラボの衛生を守ってください。
- ・ PCR プレートもしくは 8 strip tube の cap strip を外す必要のある工程では、再びキャップをするときには、常に新しい cap strip を使用してください。サーマルサイクラやその他の工程で、cap の変形が起こりえるため、一度使用した cap strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- ・ Biosafety Level 1 (BSL1)のルールに基づき、実験を行います。
- ・ プロトコル中に表記されている Stopping Point でサンプルを 4°Cまたは-20°Cで保存する場合は、サンプルの繰り返し凍結融解は避けてください。

安全に関する注意

CAUTION

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

1. はじめに

実験に必要な試薬・器具

この章では、SureSelect XT HS2 mRNA プロトコルに必要な試薬や器具を表にまとめています。

表 1 から SureSelect XT HS2 mRNA 試薬キットを選択してください。その他に必要な試薬や器具は表 2 から表 4 を参照にしてください。

表 1 複数タイプの SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット

SureSelect XT HS2 RNA試薬キット (実験する反応数に応じて製品を選択してください。)					
品名	製造メーカー	品番	指定/相当品	内容量	備考
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (16 反応分) *	Agilent	G9995A	指定	16反応分	マルチプレックス対応 (index 1-16)
		G9997A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (96 反応分) †	Agilent	G9997B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9997C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9997D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
			指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure® XPビーズ付き 16反応分) *	Agilent	G9996A	指定	16反応分	マルチプレックス対応 (index 1-16)
		G9998A	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 1-96)
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure® XPビーズ付き96反応分) †	Agilent	G9998B	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 97-192)
		G9998C	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 193-288)
		G9998D	指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)
			指定	96反応分	マルチプレックス対応 (index 289-384)

*16反応キットには1ランあたりに8サンプルを含めた場合の2ラン分に相当する量が含まれます。

†96反応のキットには1ランあたりに24サンプルを含めた場合の4ラン分に相当する量が含まれます。

‡AMPure, BeckmanおよびBeckman CoulterはBeckman Coulter, Inc.の商標または登録商標です。

表 2 必要な試薬

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

※SureSelect DNA AMPure® XP BeadsおよびSureSelect Streptavidin Beadsを含んでいるSureSelect XT HS2 RNA Reagent kit (G9996A, G9998A, G9998B, G9998CあるいはG9998D)をご利用の場合は、別途購入する必要はありません。

表 3 必要な消耗品

必要な機器、消耗品類					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
サーマルサイクラー (96ウェル、0.2 mlブロック)			相当		HotTop使用
サーマルサイクラーに適したプラスチック製品： ・96-well tube plates または8-well strip tubes ・ドーム型のcap strips			相当		
低吸着チューブ ・1.5 mL ・0.5 mL	Eppendorf	022431021	相当	250本	核酸の吸着が少ない低吸着タイプ（RNase、DNaseおよびDNAフリー）を使用してください。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当		1.5mLチューブスピンドウン用。卓上遠心機でも可能。（例：日本ミリポア チビタン II）
96ウェルプレートもしくは8 strip tubes 遠心機	KUBOTA または ワケンピーテック		相当		96ウェルプレートもしくは8 strip tubesのスピンドウン用 ・96ウェルプレート用：PlateSpin II (KUBOTA)
低容量分光光度計	Thermo Fisher Scientific	ND-2000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		多検体を同時に行うときに便利です。
ピペット	Pipetman	P10,P20, P200,P1000	相当		
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、 エアロゾルブロックフィルター付き					
ボルテックスミキサ					
アイスバケツ					
パウダーフリー手袋					
ビーズ分離用マグネット	Thermo Fisher Scientific	12331D	相当		Dyna-Mag-96 (12331D) は96 well plate・8連チューブ兼用。 マグナススタンド [日本ジェネティクス] (p/n FG-SSMAG2) も使用可（8連チューブ用）。 注意：ウェルの一方に磁気ビーズが集まるタイプを必ず選んでください。リング状に磁気ビーズが集まるタイプは使用不可。

1. はじめに

表 4 核酸の QC プラットフォーム – いずれかの装置を選んでください。

ライブラリQC用 (お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用・バイオアナライザ用・Fragment Analyzer用のいずれかの消耗品をご用意下さい。)					
品名	製造メーカー	品番	指定/	内容量	備考
RNA/DNA解析用の電気泳動装置 (いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。)					
Agilent 4200/4150 TapeStation System	Agilent	G2991BA/ G2992AA	指定		RNAの定性に使用することができます。 DV200を計測するにはTapeStation Analysis software A.02.02以降が必要です。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939BA	指定		RNAの定性に使用することができます。 DV200を計測するにはExpert Control Software ver B.02.08以降が
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer	Agilent	M5310AA/ M5311AA/ M5312AA	指定		
Agilent 4150/ 4200 TapeStation消耗品					
Agilent TapeStation RNA ScreenTape	Agilent	5067-5576	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation RNA ScreenTape Sample buffer	Agilent	5067-5577	指定	最大 112サンプル分	
Agilent TapeStation RNA ScreenTape Ladder	Agilent	5067-5578	指定	10 ul	1ul/回
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape Sample buffer	Agilent	5067-5580	指定	最大 112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder	Agilent	5067-5581	指定	10 ul	1ul/回
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	7枚	1枚で最大16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	最大 112サンプル分	
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	最大 112サンプル分	
96-well sample plate	Agilent	5042-8502	指定		
96-well plate foil seals	Agilent	5067-5154	指定		
8-well tube strips	Agilent	401428	指定		
8-well tube strip caps	Agilent	401425	指定		
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品					
Agilent RNA 6000 Pico kit	Agilent	5067-1513	指定	25ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。
Agilent RNA 6000 Nano kit	Agilent	5067-1511	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer消耗品					
RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-471-0500	指定		
HS RNA Kit (15NT)	Agilent	DNF-472-0500	指定		
NGS Fragment Kit (1-6000 bp)	Agilent	DNF-473-0500	指定		

オプションの消耗品

表 5 オプションの消耗品

その他オプションの試薬・装置					
品名	製造メーカー	品番	指定/ 相当品	内容量	備考
Tween 20	Sigma Aldrich	P9416-50ML	相当	50 mL	シーケンスライブラリの保存のために 使用します。
Optical Caps, 8x strip (flat)			相当		サーマルサイクラーを使用しないステップで チューブや96ウェルプレートに蓋をする際に 使用します。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4311971	相当		PCRの機種によっては、stripキャップのかわり にシールを使用できますが、液が蒸発しや すくなる場合があるので、十分な注意とテス トが必要です。HotTop対応のものをお使い ください。
PlateLoc Thermal Microplate Sealer with Small Hotplate	Agilent	G5402A	相当		96 well plateのシールに使用。
Peelable Aluminium Seal for PlateLoc Sealer	Agilent	24210-001	相当		

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成



2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

Step 1. total RNA の準備と質の評価.....	16
Step 2. total RNA からのポリ A 選択	18
Step 3. mRNA サンプルの断片化	21
Step 4. 1st ストランド cDNA 合成	22
Step 5. Second strand cDNA 合成.....	23
Step 6. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製	24

この章では、mRNA エンリッチメントと RNA の断片化を含むインプット RNA サンプルの準備と、シーケンスライブラリ調製に先立ち RNA 断片をストランド特異性のある cDNA へ変換するステップを説明します。

本プロトコルは、新鮮または新鮮凍結サンプル由来の質のいい RNA に適しています。FFPE 由来 RNA には推奨しません。

この章に含まれるプロトコルステップでは、15 ページの表 6 および表 7 の試薬を使用します。操作を始める前に表 6 の試薬を室温にし、表 7 の試薬を融解して氷上におきます。使用前に各試薬は指示の通りに混合してください。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

表 6 mRNA エンリッチメント操作で使用する前に室温にする試薬

Kit Component	Storage Location	Where Used
Oligo(dT) Microparticles (tube with brown cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	18 ページ
Bead Washing Buffer (bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	18 ページ
Bead Elution Buffer (tube with green cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR), 4°C	19 ページ
Bead Binding Buffer (tube with purple cap or bottle)	SureSelect Poly-A Selection Module(Pre PCR), 4°C	19 ページ

表 7 断片化および cDNA 合成ステップで使用する前に融解・氷上におく試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
2X Priming Buffer (tube with purple cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	21 ページ
First Strand Master Mix (amber tube with amber cap)*	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice for 30 minutes then keep on ice	Vortexing	22 ページ
Second Strand Enzyme Mix (tube with blue cap or bottle)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	23 ページ
Second Strand Oligo Mix (tube with yellow cap)	SureSelect cDNA Module (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	23 ページ

*Fist Strand Master Mix はアクチノマイシン D を含んでおり、特別な準備が必要なく使用できます。光の暴露から守るため、提供されている琥珀色のチューブから移し替えないでください。

NOTE

24 ページのステップで使用する準備のため、冷蔵保存の AMPure XP ビーズを室温に移し、30 分以上置きます。ビーズは凍結しないでください。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

Step 1. total RNA の準備と質の評価

開始前に、各 total RNA をヌクレアーゼフリー水に調製します。ライブラリ調製には 10 ng ~ 1ug の質の高い total RNA が必要です。次に示すように、RNA integrity が低い RNA は、50 ng 以上の RNA が必要です。

NOTE

本プロトコルは、新鮮あるいは新鮮凍結サンプル由来の質の高い RNA に適しています。FFPE 由来 RNA サンプルには推奨しません。

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

1. 各 total RNA をヌクレアーゼフリー水に調製します。
2. 少量で計測できる分光光度計を用いて RNA の濃度を計測します。260/280 および 260/230 の吸光度比が両方とも約 1.8 から 2.0 であることを確認します。2.0 より極端に値が乖離している場合は、NGS ライブラリ調製の前に再精製が必要な場合があります。
3. 12 ページの表 4 にある RNA の質を確認するプラットフォームのいずれかを使用して、RNA Integrity Number (RIN) または同等の数値で RNA の質を分析します。これらアジレントのプラットフォームで算出される RIN/RIN[®]/RQN スコアは同等に RNA の分解度を示します。上記ステップ 2 で計測した濃度に基づいて、各プラットフォームのアッセイを選択します。最適な性能を得るために、total RNA サンプルは RIN > 8 が必要です。RIN > 8 のサンプルは、ライブラリ調製に 10 ng ~ 1 ug の total RNA を使用します。RIN が 6 ~ 8 のサンプルも本プロトコルで使用できますが、50 ng 以上の total RNA を使用してください。

NOTE

RIN が 6 ~ 8 の低い質の RNA サンプルを用いてライブラリを調製する場合、後のステップで追加精製が必要です (32 ページをご覧ください)。

RIN < 6 のサンプルは本プロトコルには適していません。キャプチャを行う SureSelect XT HS2 RNA system をお勧めします。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

4. 各 RNA サンプルを 96 ウェルプレートまたはストリップチューブの各ウェルに分注し、ヌクレアーゼフリー水で 25 ul に調製します。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

Step 2. total RNA からのポリ A 選択

このステップでは、オリゴ(dT)磁石ビーズに 2 回結合させることで、ポリ A 付加された mRNA を選択的にエンリッチします。

1. Oligo (dT) Microparticles を懸濁液の色が均一になり安定するまで、ボルテックスミキサでよく混合します。ボルテックス後もビーズが凝集している場合は、懸濁液が均一になるまで吸引と吐出を繰り返しピペティングよく混ぜます。
2. 均一になった Oligo (dT) 懸濁液 25 ul を各 total RNA サンプルウェルに添加します。
3. ウェルにふたをし、5 秒間穏やかにボルテックスで混合します。ビーズが沈殿しない程度にプレートまたはストリップチューブを高速遠心機や卓上遠心機でスピンドウンします。
4. プレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラに移し、表 8 のプログラムで RNA を変性させます。

表 8 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

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 50 ul に設定します。

NOTE

蓋を加熱できるタイプのサーマルサイクラを使用する場合、ライブラリ調製のインキュベーションステップでは蓋は加熱しておきます。

5. サーマルプログラムが 4 °C Hold のステップになったら、プレートまたはストリップチューブを取り出し室温で 5 分間インキュベートし、oligo(dT) ビーズに poly-A mRNA を結合させます。
6. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに移し、室温で溶液が透明になるまで静置します (約 2~5 分)。
7. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、透明になった溶液をピペットで各ウェルから注意深く取り除き廃棄します。溶液を除去するときにビーズに触れないように注意します。
8. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドから外し、200 ul の Washing Buffer を各ウェルに静かに添加します。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

P200 ピペットを 150 ul に設定し、泡立たせないように吸引と吐出を 10 回繰り返し、ピペティングで静かに混合します。

CAUTION

Bead Washing Buffer は界面活性剤を含みます。泡や泡沫を発生させないようにビーズと Washing buffer を混合することが重要です。もし洗浄ステップで泡や泡沫が発生したら、次のステップに進む前に、プレートまたはストリップチューブを軽く遠心してください。

9. プレートまたはストリップチューブを室温で磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで、少なくとも 2 分間静置します。
10. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、透明になった溶液をピペットで各ウェルから注意深く取り除き廃棄します。溶液を除去するときにビーズに触れないように注意します。
11. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドから外し、25 ul の Bead Elution Buffer を各ウェルに静かに添加します。
12. ウェルにふたをし、5 秒間穏やかにボルテックスで混合します。高速遠心機や卓上遠心機でプレートまたはストリップチューブをスピンドウンし液を集めます。
13. プレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラに移し、表 9 のプログラムを開始します。

表 9 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

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 25 ul に設定します。

14. サーマルプログラムが 4 °C Hold のステップになったら、プレートまたはストリップチューブを取り出し、各サンプルウェルに 25 ul の Bead Binding Buffer を添加します。
15. ウェルにふたをし、5 秒間穏やかにボルテックスで混合します。高速遠心機や卓上遠心機でプレートまたはストリップチューブをスピンドウンし液を集めます。
16. 室温で 5 分インキュベートし、再度 poly-A mRNA をビーズに結合させます。
17. プレートまたはストリップチューブを室温で磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで少なくとも 2 分間静置します。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

18. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、透明になった溶液をピペットで各ウェルから注意深く取り除き廃棄します。溶液を除去するときにビーズに触れないように注意します。
19. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドから外し、200 ul の Bead Washing Buffer を各ウェルに静かに添加します。
P200 ピペットを 150 ul に設定し、泡立たせないように吸引と吐出を 10 回繰り返し、ピペティングで静かに混合します。もし洗浄ステップで泡や泡沫が発生したら、次のステップに進む前にプレートまたはストリップチューブを軽く遠心してください。
20. プレートまたはストリップチューブを室温で磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで少なくとも 2 分間静置します。
21. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、透明になった溶液をピペットで各ウェルから注意深く取り除き廃棄します。溶液を除去するときにビーズに触れないように注意します。
22. ビーズに結合した RNA サンプルのプレートまたはストリップチューブを磁石スタンドから外します。10 ul のヌクレアーゼフリー水を各サンプルウェルに添加し、氷上に置きます。
23. すぐに 21 ページの「Step 3. mRNA サンプルの断片化」に進みます。

Step 3. mRNA サンプルの断片化

このステップでは、金属イオンを添加し高温で処理することで、エンリッチされたポリ A 付加 mRNA サンプルを化学的に断片化し、RNA シーケンシングライブラリ調製に適したサイズにします。このステップで RNA が結合したビーズを再懸濁するために使用する 2X priming Buffer は、断片化エージェンと続くステップの cDNA 合成のためのプライマーを含みます。この章で示される断片化条件は、2 x 100 bp および 2 x 150 bp の両方の NGS リード長に対応しています。

1. 表 10 のようにサーマルサイクラのプログラムを設定します。すぐにプログラムを一時停止し、ステップ 4 でサンプルを置くまでそのままにします。

表 10 mRNA サンプルの断片化および溶出のサーマルサイクラプログラム*

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

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 20 ul に設定します。

2. ビーズに結合した RNA サンプル 10 ul の各ウェルに、2X Priming Buffer を 10 ul 添加します。
3. ウェルにふたをし、高速で遠心しビーズを再懸濁します。軽くスピンドウンし、液を集め泡を除きます。
4. サンプルをサーマルサイクラに入れ、表 10 のプログラムを開始します。このステップで、RNA は断片化され、同時に oligo(dT) ビーズから溶出されます。
5. 表 10 のサーマルプログラムが 4 °C Hold ステップに達したら、断片化 RNA サンプルのプレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラから、室温の磁石スタンドに移動します。ビーズ懸濁液が透明になるまで待ち、各上澄み（約 20 ul）を新しいプレートまたはストリップチューブのウェルに取ります。溶出された RNA サンプルは氷上におきます。この時点で oligo(dT) ビーズは廃棄します。
ビーズに RNA が再結合するのを避けるため、このステップの処理時間は最小限にしてください。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

Step 4. 1st ストランド cDNA 合成

CAUTION

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

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

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

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

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

※サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 28 ul に設定します。

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

Step 5. Second strand cDNA 合成

CAUTION

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

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

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

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

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 58 ul に設定します。

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

NOTE

次のステップで使用する AMPure XP ビーズは、少なくとも 30 分以上室温に置いておく必要があります。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

Step 6. AMPure XP ビーズによる cDNA 精製

このステップでは、cDNA ライブラリを AMPure XP ビーズで精製します。表 13 に精製プロトコルの重要な項目がまとめられています。

表 13 cDNA 合成後の AMPure XP ビーズ精製

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	105 μ l
Final elution solvent and volume	52 μ l nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	50 μ l

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

NOTE

調製した 70%エタノールは同じ日に実施する精製ステップで使用可能です。

3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. サンプルの入ったプレートまたはストリップチューブを室温に移し、均一にした 105 μ l のビーズ溶液を各 cDNA サンプルウェルに加えます。
5. ピペティングで吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5 ~ 10 秒高速でボルテックスすることで混合します。ビーズがチューブの側面やふたに跳ね上がったなら、ビーズがペレット状にならない程度に軽くスピンドウンします。
6. サンプルを室温で 5 分インキュベートします。
7. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます（約 2 ~ 5 分）。
8. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
9. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 μ l 加えます。
10. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
11. ステップ 9 とステップ 10 をもう一度繰り返し、計 2 回洗浄します。

2. インプット RNA の断片化と cDNA 合成

12. ストリップキャップでふたをし、残存のエタノールを集めるために軽くスピンドウンします。プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
13. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします（最大 2 分）。

NOTE

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

14. 各サンプルウェルに 52 ul のヌクレアーゼフリー水を加えます。
15. ストリップキャップでふたをし、プレートまたはストリップチューブを 5 秒間ボルテックスします。すべてのビーズが再懸濁され、懸濁液にビーズの塊がなく各ウェルの側面にビーズペレットが残っていないことを確認します。ビーズがペレット状にならない程度に軽くスピンドウンします。
16. 室温で 2 分間インキュベーションします。
17. プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで待ちます（最大 5 分）。
18. 透明になった 50 ul の溶液を新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

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

3. ライブラリ調製



3. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製.....	28
Step 2. cDNA3'末端の修復と dA 付加.....	29
Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション	31
Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製	32
Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅	35
Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製.	38
Step 7. ライブラリの定量と質の評価	40

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

この章のステップでは、表 14 に記載の試薬を使用します。使用前に（Where Used を参照）、表 14 に記載の方法で各試薬を融解し混合します。

複数サンプルを処理するために、各ステップでは cDNA サンプル以外の試薬混合物を余剰を含めて準備します。例として、8 または 24 サンプル分の余剰を含めた混合量を各表に記載しています。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

表 14 このステップで使用前に溶解する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions	Mixing Method	Where Used
Ligation Buffer (purple cap or bottle)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	28 ページ
T4 DNA Ligase (blue cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	28 ページ
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice (may require >20 minutes) then keep on ice	Vortexing	29 ページ
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Place on ice just before use	Inversion	29 ページ
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (green cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Thaw on ice then keep on ice	Vortexing	31 ページ

NOTE

32 ページのステップで使用する準備のため、冷蔵保存の AMPure XP ビーズを室温に移し、30 分以上置きます。ビーズは凍結しないでください。

3. ライブラリ調製

Step 1. ライゲーションマスターミックスの調製

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

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

CAUTION

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

プロトコルを通して、上部が平らなボルテックスミキサを使用してストリップチューブまたはプレートをボルテックスしてください。ボルテックスで試薬を混合したときは、十分に混合されたことを目視で確認してください。

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

表 15 ライゲーションマスターミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions [*] (includes excess)	Volume for 24 reactions [†] (includes excess)
Ligation Buffer (purple cap or bottle)	23 µl	207 µl	598 µl
T4 DNA Ligase (blue cap)	2 µl	18 µl	52 µl
Total	25 µl	225 µl	650 µl

*16 反応分のキットのサポートされている最少サンプル数は、1 回あたり 8 サンプルです。各 8 サンプルを 2 回実行するための十分な量の試薬がキットに含まれています。

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 2. cDNA3'末端の修復と dA 付加

1. 表 16 に従って末端修復と dA 付加のためのサーマルサイクラのプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止します。

表 16 末端修復と dA 付加のためのサーマルサイクラプログラム*

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

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 70 ul に設定します。

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

CAUTION

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

3. 表 17 に従って適切な量の dA 付加マスターミックスを調製します。

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

表 17 末端修復と dA 付加のマスターミックス

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
End Repair-A Tailing Buffer (yellow cap or bottle)	16 µl	144 µl	416 µl
End Repair-A Tailing Enzyme Mix (orange cap)	4 µl	36 µl	104 µl
Total	20 µl	180 µl	520 µl

3. ライブラリ調製

4. 末端修復と dA 付加のマスターミックス 20 ul を、約 50 ul の精製した cDNA が入った各サンプルウェルに加えます。ピペットを 50 ul に設定し吸引と吐出を 15 ~ 20 回繰り返し混合するか、ウェルにふたをして高速のボルテックスで 5 ~ 10 秒混合します。
5. サンプルを軽くスピンドウンし、すぐに PCR プレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラにセットし、[表 16](#) のサーマルサイクラプログラムを再開します。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 3. 分子バーコード付きアダプターのライゲーション

1. サーマルサイクラが 4 °C Hold のステップになったら、サンプルを氷上に移動し、以下のステップ中は氷上においておきます。
2. 表 18 にしたがってライゲーションのためにサーマルサイクラのプログラムを設定します。開始してすぐに一時停止ボタンを押し、ステップ 5 でサンプルをセットするまで停止しておきます。

表 18 ライゲーションのためのサーマルサイクラプログラム*

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

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 100 ul に設定します。

3. 末端修復し dA 付加をした各 cDNA サンプル (約 70 ul) に、28 ページで調製し室温においていたライゲーションマスターミックス 25 ul を添加します。70 ul に設定したピペットで吸引と吐出を少なくとも 10 回繰り返し良く混合するか、シールまたはふたをして高速のボルテックスで 5~10 秒混合します。
4. SureSelect XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix (緑のキャップのチューブ) を 5 ul ずつ各サンプルに加えます。ピペットを 70 ul に設定し吸引と吐出を少なくとも 15~20 回繰り返しピペッティングで良く混合するか、シールまたはふたを閉めて高速のボルテックスで 5~10 秒混合します。

NOTE

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

5. 軽くスピンドウンし溶液を集め、すぐに PCR プレートまたはストリップチューブをサーマルサイクラにセットし、表 18 のサーマルサイクラプログラムを再開します。

NOTE

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

3. ライブラリ調製

Step 4. AMPure XP ビーズによるサンプル精製

このステップでは、アダプター付加された cDNA ライブラリを AMPureXP ビーズで精製します。100 ng 未満の total RNA や質の低い RNA サンプル (RIN 6~8) から作製したライブラリは、追加の精製を行います。

表 19 に精製 1 回の場合、表 20 に精製 2 回の場合の重要な項目がまとめられています。

プロトコルの詳細は 32~34 ページにあります。

表 19 インプット量 100 ng 以上かつ RIN \geq 8 の RNA から調製されたライブラリを AMPure XP ビーズで 1 回精製する場合

Parameter	Value
Rounds of purification required	1×
Volume of 70% ethanol to be prepared	400 μ l per sample
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	80 μ l
Final elution solvent and volume	35 μ l nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 34 μ l

表 20 インプット量 100 ng 未満または RIN 6~8 の RNA から調製されたライブラリを AMPure XP ビーズで 2 回精製する場合

Parameter	Value
Rounds of purification required	2×
Volume of 70% ethanol to be prepared	800 μ l per sample
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	Round 1: 80 μ l Round 2: 60 μ l
Final elution solvent and volume	Round 1: 50 μ l nuclease-free water Round 2: 35 μ l nuclease-free water
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Round 1: 50 μ l Round 2: Approximately 34 μ l

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70 %エタノールを準備します。必要な量は表 19 または表 20 を参照してください。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

4. 各 cDNA サンプル (約 100 μ l) に、均一にした 80 μ l のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。ピペティングで吸引と吐出を 15~20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5~10 秒高速でボルテックスすることで混合します。
5. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます (約 5~10 分)。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
8. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 μ l 加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 をもう一度繰り返します。
11. ストリップキャップでふたをし、軽くスピンドウンします。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
12. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします (約 1~2 分)。
13. 表 21 に従って適切な量のヌクレアーゼフリー水を各ウェルに添加します。

表 21 インプット RNA に応じた溶出量

Total RNA Input Quantity/Quality	Elution Volume	Rounds of Purification Required
≥ 100 ng AND RIN ≥ 8	35 μ l	1 \times
< 100 ng OR RIN 6–8	50 μ l	2 \times

14. ストリップキャップでふたをし、ボルテックスミキサでよく混合しスピンドウンをして液を集めます。
15. 室温で 2 分間インキュベートします。
16. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで約 5 分待ちます。
17. 透明になった上澄み液 (約 34 μ l または 50 μ l、表 22 参照) を新しい PCR プレートまたはストリップチューブに分注し、氷上におきます。この時点でビーズは廃棄します。

3. ライブラリ調製

表 22 インプット RNA に応じた上澄み液の分注量

Total RNA Input Quantity/Quality	Rounds of Purification Required	Volume of Supernatant Collected*
≥100 ng AND RIN≥8	1×	34 µl
<100 ng OR RIN 6–8	2×	50 µl

* 精製を 1 回しか行わないサンプルは、35 ul の溶出液のうち 34 ul を除くことでビーズのキャリーオーバーを防ぎます。精製を 2 回行うサンプルは、少量のキャリーオーバーは許容されます。これらのサンプルは 50 ul の上澄み液全体を集めてください。

18. 100 ng 以上かつ RIN ≥ 8 の total RNA から調製されたサンプルの場合は、35 ページの **Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅に進みます。**

少量または質が低い RNA サンプルから調製されたサンプルは、次のステップ 19 とステップ 20 を行います。

少量 (< 100 ng) または質が低い (RIN 6 ~ 8) RNA から調製されたライブラリのみ：

19. 均一にした 60 ul の AMPure XP ビーズを PCR プレートまたはストリップチューブ中の各 50 ul のサンプルに加えます。ピペティングで吸引と吐出を 15~20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5~10 秒高速でボルテックスすることで混合します。

20. 33 ページのステップ 5 から精製ステップを繰り返します。ステップ 13 では、再精製 cDNA を 35 ul のヌクレアーゼフリー水で溶出し、ステップ 14 から 17 を行います。

ステップ 17 で 34 ul の再精製した上澄み液を回収した後、35 ページの **Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅に進みます。**

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 5. アダプター付加した cDNA ライブラリの増幅

このステップでは表 23 の試薬を使用します。開始前に表中の試薬を融解し氷上におきます。

表 23 PCR 増幅のための試薬

Component	Storage Location	Mixing Method	Where Used
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Pipette up and down 15–20 times	37 ページ
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	37 ページ
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs	SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR), -20°C	Vortexing	37 ページ

*インデックスプライマーペアはストリップチューブ（16 反応キット）またはプレート（96 反応キット）の各ウェルに分注されています。

NOTE

38 ページのステップで使用する準備のため、冷蔵保存の AMPure XP ビーズを室温に移し、30 分以上置きます。ビーズは凍結しないでください。

1. 各サンプルに対するインデックスペアを決めます。このステップで cDNA ライブラリを増幅するためのプライマーのインデックス部分の 8 bp の塩基配列は 57 ~ 64 ページを参照してください。

同一レーンでシーケンスするサンプルには、異なるインデックスプライマーペアを使用してください。

NOTE

ストリップチューブで提供される 16 反応キットのインデックスプライマーペア 1 ~ 16 は、オレンジ色のプレートで提供される 96 反応キットの 1 ~ 16 と同じです。混合するサンプルに、ストリップチューブとプレートの同じ番号のインデックスペアは使用しないでください。

37 ページのステップ 5 で、ストリップチューブで提供されたインデックスペアを使用する場合はストリップチューブの向きを確認してください。端に 1 または 9 とある位置に近いウェルに数字の若いインデックスペアが、バーコードに近いウェルに数字の大きいインデックスペアが入っています。溶液をピペティングする直前に、ピペットチップで該当ウェルのフォイルシールを突き刺します。

3. ライブラリ調製

SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs は 1 回分の液量で提供されています。

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを避けるため、後の実験に残った試薬の再利用はしないでください。

2. 表 24 のようにサーマルサイクラのプログラムを設定します（蓋の加熱は ON にします）。開始してすぐに一時停止し、ステップ 6 でサンプルをセットするまで停止します。

表 24 PCR のサーマルサイクラプログラム*

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	8–15 RNA インプット量に応じた推奨の サイクル数は表 25 を参照してください。	98°C	30 seconds
		60°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

*サーマルサイクラの設定に必要な場合、液量は 50 ul に設定します。

表 25 PCR サイクル数のガイドライン

Quantity of Input RNA	Cycle Number
1000 ng	8 cycles
250 ng	10 cycles
100 ng	11 cycles
50 ng	13 cycles
10 ng	15 cycles

CAUTION

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

3. 表 26 に従い適切な量の PCR 反応ミックスを調製し、氷上におきます。ボルテックスミキサーでよく混合します。

表 26 PCR 反応ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 8 reactions (includes excess)	Volume for 24 reactions (includes excess)
5× Herculase II Buffer with dNTPs (clear cap)	10 µl	90 µl	260 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µl	9 µl	26 µl
Total	11 µl	99 µl	286 µl

4. 各調製 DNA ライブラリサンプル (34 µl)に、表 26 で調製した 11 µl の PCR マスターミックスを添加します。
5. 各反応液に 5 µl の適切な SureSelect XT HS2 Index Primer Pair を添加します。
ウェルにふたをして、高速のボルテックスで 5 秒間混合します。PCR プレートまたはストリップチューブを軽くスピンドウンし、液を集め泡をなくします。
6. サーマルサイクラにセットする前に、表 24 のサーマルサイクラプログラムを開始し、サーマルサイクラのブロックが 98 °Cになるまで待ちます。98 °Cに達したらすぐに、PCR プレートまたはストリップチューブをサーマルブロックにセットし蓋を閉めます。

CAUTION

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

3. ライブラリ調製

Step 6. AMPure XP ビーズによる増幅ライブラリの精製

このステップでは、増幅した DNA ライブラリを AMPure XP ビーズで精製します。表 27 に精製プロトコルの重要な項目がまとめられています。

表 27 ライブラリ増幅後の AMPure XP ビーズによる精製項目

Parameter	Value
Volume of RT AMPure XP bead suspension added to each sample well	50 μ l
Final elution solvent and volume	15 μ l 1X Low TE Buffer
Amount of eluted sample transferred to fresh well	Approximately 15 μ l

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズを室温に戻しておくようにします。
2. ステップ 8 で使用する 70%エタノールを、1 サンプルあたり 400 μ l (と余剰分) 調製します。
3. AMPure XP ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
4. 約 50 μ l の PCR 増幅サンプルに、均一にした 50 μ l のビーズ溶液を各サンプルウェルに加えます。ピペティングで吸引と吐出を 15~20 回繰り返す、またはふたを閉めて 5~10 秒高速でボルテックスすることで混合します。
5. サンプルを室温で 5 分間インキュベートします。
6. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます (約 5 分)。
7. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、ピペットで各ウェルの透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。上澄み液を除去するときビーズに触れないように注意します。
8. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットしたまま、各サンプルウェルに新鮮な 70%エタノールを 200 μ l 加えます。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. ステップ 8 とステップ 9 をもう一度繰り返します。
11. ストリップキャップでふたをし、軽くスピンドウンします。PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドに戻し 30 秒待ちます。残存エタノールを P20 のピペットで取り除きます。
12. ふたをしないで PCR プレートまたはストリップチューブを、37 °C に設定したサーマルサイクラにのせ残存エタノールが蒸発するまで乾かします (約 1~2 分)。
13. 各サンプルウェルに 15 μ l の 1x Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ~ 8.0, 0.1 mM EDTA)

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

を加えます。

14. ストリップキャップでふたをし、PCR プレートまたはストリップチューブをボルテックスでよく混合します。軽くスピンドウンし溶液を集めます。
15. 室温で2分間インキュベーションします。
16. PCR プレートまたはストリップチューブを磁石スタンドにセットし、溶液が透明になるまで2~3分待ちます。
17. 透明になった約 15 ul の上澄みを新しい PCR プレートまたはストリップチューブに移し、氷上におきます。ビーズはこの時点で廃棄します。

NOTE

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

3. ライブラリ調製

Step 7. ライブラリの定量と質の評価

各サンプルを表 28 のいずれかのプラットフォームで分析します。40 ページの SureSelect ライブラリ評価の手順を確認し、各プラットフォームのマニュアルは弊社サポートサイトをご覧ください。各分析メソッドで得られるエレクトロフェログラムは、サンプル中の断片サイズの分布を示しサンプル DNA 濃度を定量できます。断片サイズの分布のガイドラインは表 29 を参照してください。典型的な結果として、TapeStation システムで得られる代表的なエレクトロフェログラムを示しています。

表 28 ライブラリの分析オプション

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

表 29 ライブラリの評価ガイドライン

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

予想されるライブラリ断片のピークの他に低分子のピークが観察された場合、ライブラリ中のアダプターダイマーの存在を示しています。アダプターダイマーがこの章で例示しているエレクトロフェログラムのように少ない量なら、次のステップに進んでかまいません。追加の検討事項は、トラブルシューティングガイド 68 ページのトラブルシューティングを参照してください。

1. ユーザーマニュアルに従い機器のセットアップをします
2. 分析用にサンプルを準備し、ユーザーマニュアルに従いアッセイをセットアップし、ランを行います。
3. エレクトロフェログラムで、DNA 断片長が想定されるサイズか確認します（ガイドラインは表 29 を参照してください）。図 2 に TapeStation で泳動した例を示します。
表 28 にある別の泳動装置から得られるエレクトロフェログラムでも同様な断片サイズになります。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

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

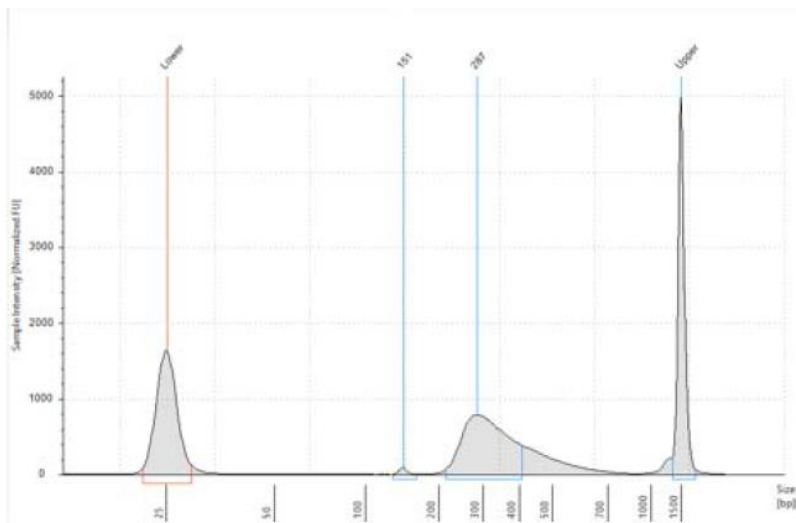


図 2 D1000 ScreenTape で分析した最終 mRNA ライブラリ

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン



4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 1. 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	43
Step 2. シーケンスサンプルの準備	45
Step 3. シーケンスの開始とデータ解析	47

この章では、インデックスと分子バーコードを付加したサンプルをマルチプレックスシーケンスに向けてプールするステップを説明します。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 1. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

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

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

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

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

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

V(f): プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f): プールに含まれる全ての DNA の最終的な濃度

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

#: プールするインデックスの数

C(i): 各インデックスサンプルの初期濃度

表 30 に 4 種のインデックスサンプル（それぞれ異なる初期濃度）の量と、最終的に 20 ul の 10 nM DNA 濃度にするのに必要な Low TE の例を示します。

表 30 10 nM の濃度でトータル 20 ul に調製する計算例

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

もしライブラリをシーケンス前に保存する場合は、Tween 20 (Sigma – Aldrich p/n P9416) を 0.1% v/v になるように加え-20 °Cで短期保存するか、お使いの NGS プラットフォームの指示に沿って保存します。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

Step 2. シーケンスサンプルの準備

最終的な SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリプールは、イルミナ社の標準的な Paired-end プライマーとケミストリーでダイレクトシーケンスする状態となっています。図 3 に示されるように、調製されたライブラリの各断片は、mRNA 由来の 1 つのインサートが、イルミナ社のプラットフォームを用いてマルチプレックスシーケンスするのに必要なシーケンスモチーフにはさまれている状態です。

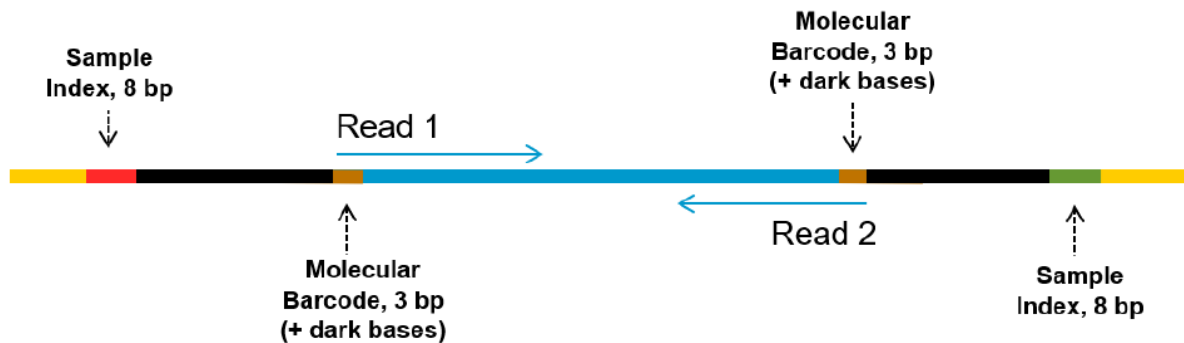


図 3 SureSelect XT HS2 mRNA シーケンスライブラリの構造

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

ライブラリはイルミナ社 HiSeq、MiSeq、NextSeq、NovaSeq プラットフォームでシーケンスすることができます。使用するランタイプとケミストリーの組み合わせは表 31 をご覧ください。

SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリに最適なシーディング濃度は、使用するシーケンスプラットフォーム、ランタイプ、イルミナ社キットのバージョンにより異なります。ガイドラインについては表 31 を参照してください。シーディング濃度とクラスタ密度も、ライブラリの DNA 断片のサイズレンジや、求められるアウトプットやデータの質に基づき、最適化が必要な場合もあります。表 31 の内容に記載されている範囲の中間のシーディング濃度から最適化を行ってください。

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

表 31 イルミナ社キット選択ガイドライン

Platform	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry	Seeding Concentration
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4	12–14 pM
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2	9–10 pM
MiSeq	All Runs	2 × 75 bp	150 Cycle Kit	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v2.5	1.2–1.5 pM
HiSeq 3000/4000	All Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Standard Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp Workflow Runs	2 × 100 bp or 2 × 150 bp	300 Cycle Kit	v1.0 or v1.5	200–400 pM

Step 3. シーケンスの開始とデータ解析

以下のガイドラインは、SureSelect XT HS2 RNA ライブラリのシーケンスのランセットアップと解析の概要です。続くガイドラインに詳細な説明があります。

- ・ サンプルレベルインデックスには 8 bp のインデックスリードが必要です。インデックス塩基配列情報については 57 ~ 64 ページをご参照ください。
- ・ HiSeq・NextSeq・NovaSeq プラットフォームでは、装置のユーザインターフェースからランのセットアップを行いません。48 ページのガイドラインに従ってください。
- ・ MiSeq プラットフォームでは、Illumina Experiment Manager (IEM)を用いてランのセットアップを行います。48 ページに記載されている手順に従い、カスタムサンプルシートを作成します。
- ・ Illumina Experiment Manager (IEM)のアダプタートリミングのオプションは使用しないでください。シーケンスのラン設定をする際に、IEM のアダプタートリミングオプションのチェックボックスは外れていることを確認してください。次に説明するように、アダプター配列に含まれる分子バーコードを適切に処理するため、後の処理工程でアダプターをトリミングします。
- ・ イルミナ社の bcl2fastq、BCL Convert または DRAGEN ソフトウェアを使用して、デュアルインデックスに基づいたペアエンドリードを作成し、P5 および P7 の間違っただけのペアを除きデマルチプレックスを行います。
- ・ Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) や SureCall ソフトウェアで FASTQ ファイルを処理する場合は、イルミナ社のデマルチプレックスソフトウェアの MBC/UMI トリミングオプションは使用しないでください。
- ・ リファレンス配列にリードをアラインメントする前に、アダプター配列中の MBC を適切に処理できるアジレント AGeNT のトリマーモジュールで Illumina アダプター配列をリードから除く必要があります。詳細は 51 ページを参照してください。
- ・ ライブラリフラグメントは、各ストランドに degenerated 分子バーコードが含まれます (45 ページ [図 3](#) 参照)。両方のストランドが存在し、ストランド内の MBC を一致させて二重のコンセンサスリードを形成する DNA とは異なり、一本鎖 RNA の解析は片方の鎖の分子バーコードを使用したコンセンサスリードの形成に限定されることに注意してください。
- ・ 分子バーコード配列と dark base は、リード 1 およびリード 2 両方の 5'端に含まれます。分子バーコードの抽出やトリミングは AGeNT を使用してください (詳細は 51 ページをご覧ください)。ご使用のシーケンス解析パイプラインが分子バーコードを排除し、AGeNT と互換性がない場合、51 ページの Note にあるように、アラインメント前に各リードの最初の 5 塩基をトリミングするかマスクしてください。

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

【HiSeq/NextSeq/NovaSeq プラットフォームによるシーケンスのセットアップガイドライン】
装置のコントロールソフトウェアの画面から、表 32 に従ってシーケンスのランセットアップを行います。HiSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面の Run configuration スクリーンで Dual Index を選び表 32 のサイクル数を入力します。

NextSeq または NovaSeq では、装置のコントロールソフトウェアの画面で Run Setup スクリーンを立ち上げ表 32 のリード長を入力します。カスタムプライマーセクションでは、すべてのプライマー (Read1, Read2, Index1 および Index2) のチェックボックスを外します。

表 32 ラン設定

Run Segment	Cycles/Read Length
Read 1	100 or 150
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	100 or 150

【MiSeq プラットフォームによるシーケンスのセットアップガイドライン】

以下の手順に従い、Illumina Experiment Manager (IEM)ソフトウェアを用いてカスタム Sample Sheet を作成します。Sample Sheet を作成した後は、インデックス配列を手作業で、使用した各サンプルの SureSelect XT HS2 インデックスの配列に変更する必要があります。SureSelect XT HS2 インデックスペアの塩基配列は、57 ページの表 39 ~ 64 ページの表 46 を参照してください。

カスタム Sample Sheet のセットアップ

1. IEM ソフトウェア中で、以下の Workflow を選択し、MiSeq プラットフォームの Sample Sheet を作成します。
 - Category から Other を選択
 - Application から FASTQ Only を選択
2. Workflow Parameters 画面上で、ラン情報を入力し、下図でハイライトしているキーとなるパラメータが、下図の内容になっていることを確認します。

Library Prep Workflow の項目は、TruSeq Nano DNA を選択します。Index Adapters の項目は TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)を選択します。アダプタートリミングはアジレント AGeNT で行う必要があるため、FASTQ Only Workflow-Specific Setting 内の

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

adaptor-trimming チェックボックス（下図赤で囲んだ部分）は両方とも外します（デフォルトでチェックが入っています）。

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

FASTQ Only Run Settings

Reagent Cartridge Barcode* MS5871369-300V2

Library Prep Workflow TruSeq Nano DNA

Index Adapters TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)

Index Reads 0 (None) 1 (Single) 2 (Dual)

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date 1/22/2018

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1 100

Cycles Read 2 100

* - required field

FASTQ Only Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Reverse Complement

Use Adapter Trimming

Use Adapter Trimming Read 2

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

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

Samples to include in sample sheet

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

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

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

- Sample Sheet ファイルをテキストエディターで開き、それぞれのサンプルについて、カラム 5 ~ 8 の i7、i5 のインデックス情報を変更します(下図、黄色くハイライトされた部分)。SureSelect XT HS2 インデックスの塩基配列は 57 ページの表 39 ~ 64 ページの表 46 をご覧ください。
- 5 番目の i7_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。6 番目の index カラムには、適切な P7 インデックス配列を入力します。
- 7 番目の i5_Index_ID カラムには、各サンプルに割り当てられた SureSelect XT HS2 のインデックスペア番号を入力します。8 番目の index2 カラムには、適切な P5 インデックス配列を入力します。

[Header]								
Investigator Name	NN							
Project Name	Sequencing Project A							
Experiment Name	Experiment 1							
Date	3/20/2013							
Workflow	GenerateFASTQ							
Assay	SureSelect XT HS V2							
Chemistry	SureSelect XT HS V2							
[Reads]								
	100							
	100							
[Settings]								
OnlyGenerateFASTQ	1							
[Data]								
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	i7_Index_ID	index	i5_Index_ID	index2	Sample_
Sample 1	Sample1	Plate1	A01	01	CAAGGTGA	01	ATGGTTAG	
Sample 2	Sample2	Plate1	A02	02	TAGACCAA	02	CAAGGTGA	
Sample 3	Sample3	Plate1	A03	03	AGTCGCGA	03	TAGACCAA	

図 4 SureSelect XT HS2 ライブラリのシーケンスのための sample Sheet

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

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

【データ解析リソース】

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

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

デマルチプレックスを行った FASTQ データは、Agilent Genomics NestGen Toolkit (AGeNT) を用いて前処理し、シーケンシングアダプターの除去および分子バーコード (MBC) 配列の抽出を行う必要があります。AGeNT は Java ベースのソフトウェアモジュールで、MBC の前処理、アダプターのトリミングやデュプリケートリードの識別を行います。この toolkit は、バイオインフォマティクスのエキスパートの方向けで、インターナルな解析パイプラインの構築、統合、メンテナンスおよびトラブルシュートができるようにデザインされています。詳細な情報や toolkit のダウンロードは www.genomics.agilent.com の AGeNT ページをご覧ください。XT HS2 RNA ライブラリに適した処理については AGeNT Best Practices のドキュメントをご覧ください。

NOTE

お使いの解析パイプラインで MBC を除く場合、次の解析ステップに進む前にリード 1 およびリード 2 の最初の 5 塩基をマスキングまたはトリミングすることで除けます。bcl2fastq でデマルチプレックスをする場合は、ベースマスク **N5Y*,I8,I8,N5Y*** (*は実際のリード長に置き換えてください。RunInfo.xml ファイルのリード長です) を含めることで MBC をマスキングします。BCL Convert でデマルチプレックスをする場合は、サンプルシートのヘッダーに以下の文字列を含めることで MBC をトリミングします: **OverrideCycles,N5Y*;I8,I8,N5Y*** (*はトリミング後の実際の長さに置き換えてください。2x 150 NGS の例: **N5Y145;I8,I8,N5Y145**)

もしくは最初の 5 塩基は、seqtk のような適切な処理ツールでデマルチプレックスした fastq ファイルからトリミングできます。AGeNT のトリミングモジュールは、MBC の除去に加えアダプター配列も除去できます。標準的なアダプタートリマーは、アライメントの質に影響を与え得る MBC の反対側のアダプター (図 3 参照) を除くことができない場合があります。

トリミングしたリードは、適切な RNA データアライメントツールを用いてアライメントする必要があります。アライメントが完了したら、AGeNT CReaK (Consensus Read Kit) ツールを使用し、一本鎖コンセンサスモードでコンセンサスリードの生成やデュプリケートのマークまたは削除す

4. マルチプレックスシーケンスのガイドライン

ることが可能です。出来上がった BAM ファイルは、遺伝子発現解析やバリエーションディスカバリを含む下流の解析に使用できます。

NOTE

CReaK は、AGeNT LocatIt ツールに代わって AGeNT version 3.0 で導入されたデデュプリケーションツールです。LocatIt と CReaK の詳しい比較は www.genomics.agilent.com の AGeNT サイトにある FAQ をご覧ください。互換性のために LocatIt は引き続き使用することができますが、CReaK が推奨されています。

RNA 鎖特異性のガイドライン

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



5. リファレンス

キット内容	54
SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報	56
インデックスプライマーペアのストリップチューブとプレート マップ	65
トラブルシューティングガイド	68
Quick Reference Protocol	70

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

5. リファレンス

キット内容

SureSelect XT HS2 mRNA 試薬キットは、表 33 に示す構成キットを含みます。表 33 にリスト化された複数の構成キットの詳細な内容は表 34 から表 37 に示します。

表 33 構成キット

Component Kit Name	Storage Condition	Component Kit Part Number	
		16 Reaction Kits	96 Reaction Kits
Standard Component Modules			
SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR)	+4°C	5190-6410	5190-6411
SureSelect cDNA Module (Pre PCR)	-20°C	5500-0148	5500-0149
SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)	-20°C	5500-0150	5500-0151
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	-20°C	5191-5687 (Index Pairs 1–16)	5191-5688 (Index Pairs 1–96), 5191-5689 (Index Pairs 97–192), 5191-5690 (Index Pairs 193–288), OR 5191-5691 (Index Pairs 289–384)
Optional Component Modules			
SureSelect RNA AMPure® XP Beads	+4°C	5191-6670*	5191-6671†

*16 反応キット G9996A のみに付属しています。

†96 反応キット G9998A、G9998B、G9998C および G9998D のみに付属しています。

表 34 SureSelect Poly-A Selection Module (Pre PCR) の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format	96 Reaction Kit Format
Oligo(dT) Microparticles	tube with brown cap	bottle
Bead Binding Buffer	tube with purple cap	bottle
Bead Washing Buffer	bottle	bottle
Bead Elution Buffer	tube with green cap	bottle

表 35 SureSelect cDNA Module (Pre PCR) の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format	96 Reaction Kit Format
2X Priming Buffer	tube with purple cap	tube with purple cap
First Strand Master Mix*	amber tube with amber cap	amber tube with amber cap
Second Strand Enzyme Mix	tube with blue cap	bottle
Second Strand Oligo Mix	tube with yellow cap	tube with yellow cap

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

表 36 SureSelect XT HS2 RNA Library Preparation Kit for ILM (Pre PCR)の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format	96 Reaction Kit Format
End Repair-A Tailing Enzyme Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
End Repair-A Tailing Buffer	tube with yellow cap	bottle
T4 DNA Ligase	tube with blue cap	tube with blue cap
Ligation Buffer	tube with purple cap	bottle
XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix	tube with green cap	tube with green cap
Herculase II Fusion DNA Polymerase	tube with red cap	tube with red cap
5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs	tube with clear cap	tube with clear cap

表 37 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)の内容

Kit Component	16 Reaction Kit Format	96 Reaction Kit Format
SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR)	Blue 8-well strip tube (index pairs 1-8), AND White 8-well strip tube (index pairs 9-16)	Orange 96-well plate (index pairs 1–96), OR Blue 96-well plate (index pairs 97–192), OR Green 96-well plate (index pairs 193–288), OR Red 96-well plate (index pairs 289–384)

5. リファレンス

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアの情報

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは、あらかじめ混合されています。各プライマーペアはユニークな 8 bp の P5 または P7 インデックスを持ち、デュアルインデックスが付加された NGS ライブラリが合成されます。1 つのプライマーペアは、8 ウェルのストリップチューブ（16 反応キット、プレートマップは 65 ページ [図 5](#) 参照）または 96 ウェルプレート（96 反応キット、プレートマップは 66 ~ 67 ページ参照）で提供されます。各ウェルに P7 および P5 プライマーのペアが、1 回分の容量で分注されています。

各プライマーのインデックス部分の塩基配列は [表 39](#) から [表 46](#) 示しています。P7 インデックスは、サポートされているイルミナプラットフォームのいずれにも対応する一方向で示しています。P5 インデックスは、異なるプラットフォームごと、シーケンシングのラン設定および Local Run Manager や Instrument Run Setup 等の管理ツールによって二方向の配列（フォワードとリバース）を表示しています。イルミナ社のシーケンスプラットフォームと P5 のシーケンス方向は [表 38](#) をご覧ください。サンプルシートやシーケンスのランセットアップ中に P5 インデックスの方向を正しく設定することは、デマルチプレックスを成功させるためにとても重要です。イルミナ社のサポートドキュメントやリソースを参照し、お使いのアプリケーションに適した正しい P5 インデックス方向を決定してください。

表 38 イルミナプラットフォームの P5 インデックスのシーケンス方向

P5 Index Orientation	Platform
Forward	NovaSeq 6000 with v1.0 chemistry MiSeq HiSeq 2500
Reverse Complement*	NovaSeq 6000 with v1.5 chemistry NextSeq 500/550/1000/2000 HiSeq 3000/4000 iSeq 100 MiniSeq HiSeq X

*これらのプラットフォームで使用される一部のラン設定・管理ツールの中には、入力された P5 インデックス配列の相補鎖配列を自動的に生成します。パイプラインで使用するプラットフォームとツールの組み合わせについては、イルミナ社のサポートドキュメントを参照し、ランのセットアップにする正しいインデックスの方向を決定してください。

表 39 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1 - 48、オレンジ色の 96 ウェルプレートまたはストリップチューブ

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

5. リファレンス

表 40 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 49-96、オレンジ色の
96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
49	A07	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	A10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACTAT
50	B07	ATGACGAA	TGAGGAGT	ACTCCTCA	74	B10	CAGTTGCG	AACGCATT	AATGCGTT
51	C07	TACGGCGA	ATGACGAA	TTCGTCAT	75	C10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D07	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	E07	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTCGCT	77	E10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	F07	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	F10	AAGAACCT	GCAATGAA	TTCATTGC
55	G07	GACTCAAT	GATCGCCT	AGGCGATC	79	G10	CTGTGCCT	AAGAACCT	AGGTTCTT
56	H07	CAGCTTGC	GACTCAAT	ATTGAGTC	80	H10	TACGTAGC	CTGTGCCT	AGGCACAG
57	A08	AGCTGAAG	CAGCTTGC	GCAAGCTG	81	A11	AAGTGGAC	TACGTAGC	GCTACGTA
58	B08	ATTCCGTG	AGCTGAAG	CTTCAGCT	82	B11	CAACCGTG	AAGTGGAC	GTCCACTT
59	C08	TATGCCGC	ATTCCGTG	CACGGAAT	83	C11	CTGTTGTT	CAACCGTG	CACGGTTG
60	D08	TCAGCTCA	TATGCCGC	GCGGCATA	84	D11	GCACGATG	CTGTTGTT	AACAACAG
61	E08	AACTGCAA	TCAGCTCA	TGAGCTGA	85	E11	GTACGGAC	GCACGATG	CATCGTGC
62	F08	ATTAGGAG	AACTGCAA	TTGCAGTT	86	F11	CTCCAAGC	GTACGGAC	GTCCGTAC
63	G08	CAGCAATA	ATTAGGAG	CTCCTAAT	87	G11	TAGTCTGA	CTCCAAGC	GCTTGGAG
64	H08	GCCAAGCT	CAGCAATA	TATTGCTG	88	H11	TTCGCCGT	TAGTCTGA	TCAGACTA
65	A09	TCCGTTAA	GCCAAGCT	AGCTTGGC	89	A12	GAACAAAG	ATACGAAG	CTTCGTAT
66	B09	GTGCAACG	TCCGTTAA	TTAACGGA	90	B12	AAGCCATC	GAGATTCA	TGAATCTC
67	C09	AGTAACGC	GTGCAACG	CGTTGCAC	91	C12	AACTCTTG	AAGCCATC	GATGGCTT
68	D09	CATAGCCA	AGTAACGC	GCGTACT	92	D12	GTAGTCAT	AACTCTTG	CAAGAGTT
69	E09	CACTAGTA	CATAGCCA	TGGCTATG	93	E12	CTCGCTAG	GTAGTCAT	ATGACTAC
70	F09	TTAGTGCG	CACTAGTA	TACTAGTG	94	F12	AGTCTTCA	CAGTATCA	TGATACTG
71	G09	TCGATACA	TTAGTGCG	CGCACTAA	95	G12	TCAAGCTA	CTTCGTAC	GTACGAAG
72	H09	ATAGTGAC	TCGATACA	TGTATCGA	96	H12	CTTATCCT	TCAAGCTA	TAGCTTGA

表 41 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97 - 144、青い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
97	A01	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	A04	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	B01	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	B04	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	C01	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGTT	123	C04	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D01	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D04	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	E01	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAACT	125	E04	CGTCAAGA	CACACATA	TATGTGTG
102	F01	GCTACGCA	GTTGGTGT	ACACCAAC	126	F04	TTCGCGCA	CGTCAAGA	TCTTGACG
103	G01	TCAACTGC	GCTACGCA	TGCGTAGC	127	G04	CGACTACG	TTCGCGCA	TGCGCGAA
104	H01	AAGCGAAT	TCAACTGC	GCAGTTGA	128	H04	GAAGGTAT	CGACTACG	CGTAGTCG
105	A02	GTGTTACA	AAGCGAAT	ATTCGCTT	129	A05	TTGGCATG	GAAGGTAT	ATACCTTC
106	B02	CAAGCCAT	GTGTTACA	TGTAACAC	130	B05	CGAATTCA	TTGGCATG	CATGCCAA
107	C02	CTCTCGTG	CAAGCCAT	ATGGCTTG	131	C05	TTAGTTGC	CGAATTCA	TGAATTCG
108	D02	TCGACAAC	CTCTCGTG	CACGAGAG	132	D05	GATGCCAA	TTAGTTGC	GCAACTAA
109	E02	TCGATGTT	TCGACAAC	GTTGTCGA	133	E05	AGTTGCCG	GATGCCAA	TTGGCATC
110	F02	CAAGGAAG	TCGATGTT	AACATCGA	134	F05	GTCCACCT	AGTTGCCG	CGGCAACT
111	G02	ATTGATGC	AGAGAATC	GATTCTCT	135	G05	ATCAAGGT	GTCCACCT	AGGTGGAC
112	H02	TCGCAGAT	TTGATGGC	GCCATCAA	136	H05	GAACCAGA	ATCAAGGT	ACCTTGAT
113	A03	GCAGAGAC	TCGCAGAT	ATCTGCGA	137	A06	CATGTTCT	GAACCAGA	TCTGGTTC
114	B03	CTGCGAGA	GCAGAGAC	GTCTCTGC	138	B06	TCACTGTG	CATGTTCT	AGAACATG
115	C03	CAACCAAC	CTGCGAGA	TCTGCGAG	139	C06	ATTGAGCT	TCACTGTG	CACAGTGA
116	D03	ATCATGCG	CAACCAAC	GTTGGTTG	140	D06	GATAGAGA	ATTGAGCT	AGCTCAAT
117	E03	TCTGAGTC	ATCATGCG	CGCATGAT	141	E06	TCTAGAGC	GATAGAGA	TCTCTATC
118	F03	TCGCCTGT	TCTGAGTC	GACTCAGA	142	F06	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	G03	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCGA	143	G06	CTTCACGT	GAATCGCA	TGCGATTC
120	H03	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	H06	CTCCGGTT	CTTCACGT	ACGTGAAG

5. リファレンス

表 42 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 145 - 192、青い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
145	A07	TGTGACTA	CTCCGGTT	AACCGGAG	169	A10	CGCTCAGA	CTAACAAG	CTTGTTAG
146	B07	GCTTCCAG	TGTGACTA	TAGTCACA	170	B10	TAACGACA	CGCTCAGA	TCTGAGCG
147	C07	CATCCTGT	GCTTCCAG	CTGGAAGC	171	C10	CATACTTG	TAACGACA	TGTCGTTA
148	D07	GTAATACG	CATCCTGT	ACAGGATG	172	D10	AGATACGA	CATACTTG	CAAGTATG
149	E07	GCCAACAA	GTAATACG	CGTATTAC	173	E10	AATCCGAC	AGATACGA	TCGTATCT
150	F07	CATGACAC	GCCAACAA	TTGTTGGC	174	F10	TGAAGTAC	AATCCGAC	GTCGGATT
151	G07	TGCAATGC	CATGACAC	GTGTCATG	175	G10	CGAATCAT	TGAAGTAC	GTACTTCA
152	H07	CACATTCG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	H10	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTCTG
153	A08	CAATCCGA	CACATTCG	CGAATGTG	177	A11	TCGAAGGA	TGATTGGC	GCCAATCA
154	B08	CATCGACG	CAATCCGA	TCGGATTG	178	B11	CAGTCATT	TCGAAGGA	TCCTTCGA
155	C08	GTGCGCTT	CATCGACG	CGTCGATG	179	C11	CGCGAACA	CAGTCATT	AATGACTG
156	D08	ATAGCGTT	GTGCGCTT	AAGCGCAC	180	D11	TACGGTTG	CGCGAACA	TGTTCCGG
157	E08	GAGTAAGA	ATAGCGTT	AACGCTAT	181	E11	AGAACCGT	TACGGTTG	CAACCGTA
158	F08	CTGACACA	GAGTAAGA	TCTTACTC	182	F11	AGGTGCTT	AGAACCGT	ACGGTTCT
159	G08	ATACGTGT	CTGACACA	TGTGTCAG	183	G11	ATCGCAAC	AGGTGCTT	AAGCACCT
160	H08	GACCGAGT	ATACGTGT	ACACGTAT	184	H11	GCCTCTCA	ATCGCAAC	GTTGCGAT
161	A09	GCAGTTAG	GACCGAGT	ACTCGGTC	185	A12	TCGCGTCA	GCCTCTCA	TGAGAGGC
162	B09	CGTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	B12	GAGTGCCT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	C09	CGTTAACG	CGTTCGTC	GACGAACG	187	C12	CGAACACT	GCATAAGT	ACTTATGC
164	D09	TCGAGCAT	CGTTAACG	CGTTAACG	188	D12	TAAGAGTG	AGAAGACG	CGTCTTCT
165	E09	GCCGTAAC	TCGAGCAT	ATGCTCGA	189	E12	TGGATTGA	TAAGAGTG	CACTCTTA
166	F09	GAGCTGTA	GCCGTAAC	GTTACGGC	190	F12	AGGACATA	TGGATTGA	TCATCCA
167	G09	AGGAAGAT	GAGCTGTA	TACAGCTC	191	G12	GACATCCT	AGGACATA	TATGTCCT
168	H09	CTAACAAG	AGGAAGAT	ATCTTCTC	192	H12	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

表 43 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193 - 240、緑色の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
193	A01	GTCTCTTC	GAAGCCTC	GAGGCTTC	217	A04	GCGGTATG	CACGAGCT	AGCTCGTG
194	B01	AGTCACTT	GTCTCTTC	GAAGAGAC	218	B04	TCTATGCG	GCGGTATG	CATACCGC
195	C01	AGCATACA	AGTCACTT	AAGTGACT	219	C04	AGGTGAGA	TCTATGCG	CGCATAGA
196	D01	TCAGACAA	AGCATACA	TGTATGCT	220	D04	CACAACCT	AGGTGAGA	TCTCACCT
197	E01	TTGGAGAA	TCAGACAA	TTGTCTGA	221	E04	TTGTGTAC	CACAACCT	AAGTTGTG
198	F01	TTAACGTG	TTGGAGAA	TTCTCAA	222	F04	TCACAAGA	TTGTGTAC	GTACACAA
199	G01	CGTCTGTG	TTAACGTG	CACGTAA	223	G04	GAAGACCT	TCACAAGA	TCTTGTGA
200	H01	AACCTAAC	CGTCTGTG	CACAGACG	224	H04	AGTTCTGT	GAAGACCT	AGGTCTTC
201	A02	AGAGTGCT	AACCTAAC	GTTAGGTT	225	A05	GCAGTGTT	AGTTCTGT	ACAGAACT
202	B02	TTATCTCG	AGAGTGCT	AGCACTCT	226	B05	AGGCATGC	GCAGTGTT	AACACTGC
203	C02	CATCAGTC	TTATCTCG	CGAGATAA	227	C05	AAGGTACT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GACTGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTACT	AGTACCTT
205	E02	CAGTGAGC	AAGCACAA	TTGTGCTT	229	E05	GAGTCCTA	CACTAAGT	ACTTAGTG
206	F02	GTCGAAGT	CAGTGAGC	GCTCACTG	230	F05	AGTCCTTC	GAGTCCTA	TAGGACTC
207	G02	TCTCATGC	GTCGAAGT	ACTTCGAC	231	G05	TTAGGAAC	AGTCCTTC	GAAGGACT
208	H02	CAGAAGAA	TCTCATGC	GCATGAGA	232	H05	AAGTCCAT	TTAGGAAC	GTTCTTAA
209	A03	CGGATAGT	CAGAAGAA	TTCTTCTG	233	A06	GAATACGC	AAGTCCAT	ATGGACTT
210	B03	CACGTGAG	CGGATAGT	ACTATCCG	234	B06	TCCAATCA	GAATACGC	GCGTATTC
211	C03	TACGATAC	CACGTGAG	CTCACGTG	235	C06	CGACGGTA	TCCAATCA	TGATTGGA
212	D03	CGCATGCT	TACGATAC	GTATCGTA	236	D06	CATTGCAT	CGACGGTA	TACCGTCG
213	E03	GCTTGCTA	CGCATGCT	AGCATGCG	237	E06	ATCTGCGT	CATTGCAT	ATGCAATG
214	F03	GAACGCAA	GCTTGCTA	TAGCAAGC	238	F06	GTACCTTG	ATCTGCGT	ACGCAGAT
215	G03	ATCTACCA	GAACGCAA	TTGCGTTC	239	G06	GAGCATAC	GTACCTTG	CAAGGTAC
216	H03	CACGAGCT	ATCTACCA	TGGTAGAT	240	H06	TGCTTACG	GAGCATAC	GTATGCTC

5. リファレンス

表 44 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 241 - 288、緑色の 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
193	A01	GTCTCTTC	GAAGCCTC	GAGGCTTC	217	A04	GCGGTATG	CACGAGCT	AGCTCGTG
194	B01	AGTCACTT	GTCTCTTC	GAAGAGAC	218	B04	TCTATGCG	GCGGTATG	CATACCGC
195	C01	AGCATACA	AGTCACTT	AAGTGACT	219	C04	AGGTGAGA	TCTATGCG	CGCATAGA
196	D01	TCAGACAA	AGCATACA	TGTATGCT	220	D04	CACAACCT	AGGTGAGA	TCTCACCT
197	E01	TTGGAGAA	TCAGACAA	TTGTCTGA	221	E04	TTGTGTAC	CACAACCT	AAGTTGTG
198	F01	TTAACGTG	TTGGAGAA	TTCTCAA	222	F04	TCACAAGA	TTGTGTAC	GTACACAA
199	G01	CGTCTGTG	TTAACGTG	CACGTAA	223	G04	GAAGACCT	TCACAAGA	TCTTGTGA
200	H01	AACCTAAC	CGTCTGTG	CACAGACG	224	H04	AGTTCTGT	GAAGACCT	AGGTCTTC
201	A02	AGAGTGCT	AACCTAAC	GTTAGGTT	225	A05	GCAGTGTT	AGTTCTGT	ACAGAACT
202	B02	TTATCTCG	AGAGTGCT	AGCACTCT	226	B05	AGGCATGC	GCAGTGTT	AACACTGC
203	C02	CATCAGTC	TTATCTCG	CGAGATAA	227	C05	AAGGTAAT	AGGCATGC	GCATGCCT
204	D02	AAGCACAA	CATCAGTC	GACTGATG	228	D05	CACTAAGT	AAGGTAAT	AGTACCTT
205	E02	CAGTGAGC	AAGCACAA	TTGTGCTT	229	E05	GAGTCCTA	CACTAAGT	ACTTAGTG
206	F02	GTCGAAGT	CAGTGAGC	GCTCACTG	230	F05	AGTCCTTC	GAGTCCTA	TAGGACTC
207	G02	TCTCATGC	GTCGAAGT	ACTTCGAC	231	G05	TTAGGAAC	AGTCCTTC	GAAGGACT
208	H02	CAGAAGAA	TCTCATGC	GCATGAGA	232	H05	AAGTCCAT	TTAGGAAC	GTTCTTAA
209	A03	CGGATAGT	CAGAAGAA	TTCTTCTG	233	A06	GAATACGC	AAGTCCAT	ATGGACTT
210	B03	CACGTGAG	CGGATAGT	ACTATCCG	234	B06	TCCAATCA	GAATACGC	GCGTATTC
211	C03	TACGATAC	CACGTGAG	CTCACGTG	235	C06	CGACGGTA	TCCAATCA	TGATTGGA
212	D03	CGCATGCT	TACGATAC	GTATCGTA	236	D06	CATTGCAT	CGACGGTA	TACCGTCG
213	E03	GCTTGCTA	CGCATGCT	AGCATGCG	237	E06	ATCTGCGT	CATTGCAT	ATGCAATG
214	F03	GAACGCAA	GCTTGCTA	TAGCAAGC	238	F06	GTACCTTG	ATCTGCGT	ACGCAGAT
215	G03	ATCTACCA	GAACGCAA	TTGCGTTC	239	G06	GAGCATAC	GTACCTTG	CAAGGTAC
216	H03	CACGAGCT	ATCTACCA	TGGTAGAT	240	H06	TGCTTACG	GAGCATAC	GTATGCTC

表 45 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289 - 336、赤い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
289	A01	AGATAGTG	GATGAGAT	ATCTCATC	313	A04	AGCTACAT	GATCCATG	CATGGATC
290	B01	AGAGGTTA	AGATAGTG	CACTATCT	314	B04	CGCTGTAA	AGCTACAT	ATGTAGCT
291	C01	CTGACCGT	AGAGGTTA	TAACCTCT	315	C04	CACTACCG	CGCTGTAA	TTACAGCG
292	D01	GCATGGAG	CTGACCGT	ACGGTCAG	316	D04	GCTCACGA	CACTACCG	CGGTAGTG
293	E01	CTGCCTTA	GCATGGAG	CTCCATGC	317	E04	TGGCTTAG	GCTCACGA	TCGTGAGC
294	F01	GCGTCACT	CTGCCTTA	TAAGGCAG	318	F04	TCCAGACG	TGGCTTAG	CTAAGCCA
295	G01	GCGATTAC	GCGTCACT	AGTGACGC	319	G04	AGTGGCAT	TCCAGACG	CGTCTGGA
296	H01	TCACCACG	GCGATTAC	GTAATCGC	320	H04	TGTACCGA	AGTGGCAT	ATGCCACT
297	A02	AGACCTGA	TCACCACG	CGTGGTGA	321	A05	AAGACTAC	TGTACCGA	TCGGTACA
298	B02	GCCGATAT	AGACCTGA	TCAGGTCT	322	B05	TGCCGTTA	AAGACTAC	GTAGTCTT
299	C02	CTTATTGC	GCCGATAT	ATATCGGC	323	C05	TTGGATCT	TGCCGTTA	TAACGGCA
300	D02	CGATACCT	CTTATTGC	GCAATAAG	324	D05	TCCTCAA	TTGGATCT	AGATCCAA
301	E02	CTCGACAT	CGATACCT	AGGTATCG	325	E05	CGAGTCGA	TCCTCAA	TTGGAGGA
302	F02	GAGATCGC	CTCGACAT	ATGTCGAG	326	F05	AGGCTCAT	CGAGTCGA	TCGACTCG
303	G02	CGGTCTCT	GAGATCGC	GCGATCTC	327	G05	GACGTGCA	AGGCTCAT	ATGAGCCT
304	H02	TAACCTAC	CGGTCTCT	AGAGACCG	328	H05	GAACATGT	GACGTGCA	TGCACGTC
305	A03	CACAATGA	TAACCTAC	GTGAGTTA	329	A06	AATTGGCA	GAACATGT	ACATGTTC
306	B03	GACTGACG	CACAATGA	TCATTGTG	330	B06	TGGAGACT	AATTGGCA	TGCCAATT
307	C03	CTTAAGAC	GACTGACG	CGTCAGTC	331	C06	AACTCACA	TGGAGACT	AGTCTCCA
308	D03	GAGTGTAG	CTTAAGAC	GTCTTAAG	332	D06	GTAGACTG	AACTCACA	TGTGAGTT
309	E03	TGCACATC	GAGTGTAG	CTACACTC	333	E06	CGTAGTTA	GTAGACTG	CAGTCTAC
310	F03	CGATGTCG	TGCACATC	GATGTGCA	334	F06	CGTCAGAT	CGTAGTTA	TAACCTACG
311	G03	AACACCGA	CGATGTCG	CGACATCG	335	G06	AACGGTCA	CGTCAGAT	ATCTGACG
312	H03	GATCCATG	AACACCGA	TCGGTGTT	336	H06	GCCTTCAT	AACGGTCA	TGACCGTT

5. リファレンス

表 46 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 337 - 384、赤い 96 ウェルプレート

Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Well	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
337	A07	TGAGACGC	GCCTTCAT	ATGAAGGC	361	A10	CTGAGCTA	GCACAGTA	TACTGTGC
338	B07	CATCGGAA	TGAGACGC	GCGTCTCA	362	B10	CTTGCGAT	CTGAGCTA	TAGCTCAG
339	C07	TAGGACAT	CATCGGAA	TTCCGATG	363	C10	GAAGTAGT	CTTGCGAT	ATCGCAAG
340	D07	AACACAAG	TAGGACAT	ATGTCCTA	364	D10	GTTATCGA	GAAGTAGT	ACTACTTC
341	E07	TTCGACTC	AACACAAG	CTTGTGTT	365	E10	TGTCGTCG	GTTATCGA	TCGATAAC
342	F07	GTCGGTAA	TTCGACTC	GAGTCGAA	366	F10	CGTAACTG	TGTCGTCG	CGACGACA
343	G07	GTTCAATC	GTCGGTAA	TTACCGAC	367	G10	GCATGCCT	CGTAACTG	CAGTTACG
344	H07	AAGCAGTT	GTTCAATC	GAATGAAC	368	H10	TCGTACAC	GCATGCCT	AGGCATGC
345	A08	ATAAGCTG	AAGCAGTT	AACTGCTT	369	A11	CACAGGTG	TCGTACAC	GTGTACGA
346	B08	GCTTAGCG	ATAAGCTG	CAGCTTAT	370	B11	AGCAGTGA	CACAGGTG	CACCTGTG
347	C08	TTCCAACA	GCTTAGCG	CGTAAGC	371	C11	ATTCCAGA	AGCAGTGA	TCACTGCT
348	D08	TACCGCAT	TTCCAACA	TGTTGGAA	372	D11	TCCTTGAG	ATTCCAGA	TCTGGAAT
349	E08	AGGCAATG	TACCGCAT	ATGCGGTA	373	E11	ATACCTAC	TCCTTGAG	CTCAAGGA
350	F08	GCCTCGTT	AGGCAATG	CATTGCCT	374	F11	AGACCATT	ATACCTAC	GTAGGTAT
351	G08	CACGGATC	GCCTCGTT	AACGAGGC	375	G11	CGTAAGCA	AGACCATT	AATGGTCT
352	H08	GAGACACG	CACGGATC	GATCCGTG	376	H11	TCTGTCAG	CGTAAGCA	TGCTTACG
353	A09	AGAGTAAG	GAGACACG	CGTGTCTC	377	A12	CACAGACT	TCTGTCAG	CTGACAGA
354	B09	AGTACGTT	AGAGTAAG	CTTACTCT	378	B12	GTCGCCTA	CACAGACT	AGTCTGTG
355	C09	AACGCTGC	AGTACGTT	AACGTAAT	379	C12	TGCGCTCT	GTCGCCTA	TAGGCGAC
356	D09	GTAGAGCA	AACGCTGC	GCAGCGTT	380	D12	GCTATAAG	TGCGCTCT	AGAGCGCA
357	E09	TCCTGAGA	GTAGAGCA	TGCTCTAC	381	E12	CAACAATC	GCTATAAG	CTTATAGC
358	F09	CTGAATAG	TCCTGAGA	TCTCAGGA	382	F12	AGAGAATC	CTCTCACT	AGTGAGAG
359	G09	CAAGACTA	CTGAATAG	CTATTCAG	383	G12	TAATGGTC	AGACGAGC	GCTCGTCT
360	H09	GCACAGTA	CAAGACTA	TAGTCTTG	384	H12	GTTGTATC	TAATGGTC	GACCATTA

インデックスプライマーペアのストリップチューブとプレートマップ

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1~16（16 反応キットの場合）は下図のように 8 ウェルストリップチューブで納品されます。

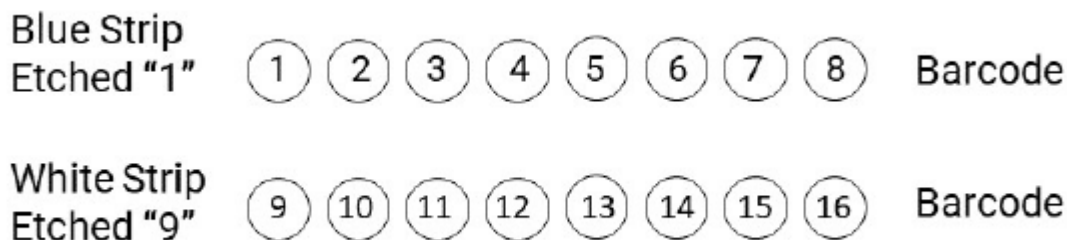


図 5 16 反応キットの SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs for ILM (Pre PCR) で提供されるストリップチューブの位置

インデックスプライマーペア 1~8 は青いストリップチューブで、キャップの端に「1」とある位置に近いウェルに 1 番目のペアが入っています。インデックスプライマーペア 9~16 は白いストリップチューブで、キャップの端に「9」とある位置に近いウェルに 9 番目のペアが入っています。

ライブラリ調製中に、ストリップチューブに入っているインデックスプライマーペアを使用する際は、溶液をピペッティングする直前に該当ウェルのフォイルシールにピペットチップで穴をあけてください。操作中に未使用のウェルのフォイルシールが破れた場合は、提供されている新しいフォイルシールで再度塞いでください。ストリップチューブについている新しいフォイルシールは、操作中のクロスコンタミネーションを防ぐために、使用後のウェルにもシール可能です。

96 反応キットの SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアのプレートマップは 66 ページの表 47 ~ 67 ページの表 50 をご覧ください。

CAUTION

SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペアは、1 回分の液量を含みます。ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐため、各ウェルはライブラリ調製反応 1 回のみ使用してください。残った溶液を繰り返し実験に使用しないでください。

5. リファレンス

表 47 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 1 - 96 (オレンジ色のプレート)のプレートマップ

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

表 48 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 97 - 192 (青いプレート)のプレートマップ

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

表 49 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 193 - 288 (緑色のプレート)の
プレートマップ

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

表 50 SureSelect XT HS2 インデックスプライマーペア 289 - 384 (赤いプレート)の
プレートマップ

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

5. リファレンス

トラブルシューティングガイド

ライブラリ収量が低い

- ✓ ライブラリ調製のプロトコルには、粘性の高いバッファや酵素液について、最適な性能を得るために推奨とする溶解・温度管理・ピペティング・混合の特異的な説明が記載されています。反応を行う際は、プロトコルに記載されているすべての内容に従って実施してください。
- ✓ Ligation Master Mix は、使用する前に必ず 30~45 分間室温に置いてください（28 ページ参照）。
- ✓ PCR サイクル数は最適化が必要な場合があります。再度、そのサンプルについては PCR 反応のサイクル数を 1~2 サイクル増やし、ライブラリ調製を試してください。
- ✓ 固層可逆固定法（SPRI）による精製ステップに不具合がある可能性があります。精製に用いている AMPure XP ビーズの使用期限をご確認ください。ビーズの保存や操作の条件は、製造元推奨の内容に従ってください。使用前は必ず 30 分以上室温においてください。SPRI の操作では、新しく調製した 70%エタノールを使用してください。
- ✓ SPRI 精製ステップでの DNA の溶出が不完全である可能性があります。サンプル溶出の前の AMPure XP ビーズを過剰に乾燥させないでください。

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

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

キャプチャ前のライブラリ断片長が想定と異なる

- ✓ SPRI 精製で得られる DNA 断片サイズは、サンプルと AMPure XP ビーズの比率に依存しません。精製ステップでビーズを分注するときは、ビーズを均等な色の均一な状態になるまでよく混合し、各精製ステップで推奨されている容量を必ず分注してください。

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

- ✓ 想定されるピーク以外に、低分子量のピークがあることは、ライブラリ中にアダプターダイマーが存在している可能性を示唆しています。41 ページの図と同程度にアダプターダイマーの割合が低い場合は、そのまま進んで問題ありません。過剰なアダプターダイマーが含まれていると、ライブラリの収量が低下する可能性があります。アダプターダイマーが多く存在する場合は、以下の点を確認してください。
 - ・ アダプターライゲーションの工程が 31 ページに記載の内容で実施されているか確認し

5. リファレンス

てください。特に、Ligation Master Mix をサンプルと混合してから、その後 XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix を混合する点に注意してください。Ligation Master Mix と Adaptor Oligo Mix を同時にサンプルに入れてはいけません。

- ・ 34 ページに記載のように、ライゲーション後に AMPure XP ビーズを使った追加の精製を行ってください。

5. リファレンス

Quick Reference Protocol

略語を用いたプロトコルステップのまとめを以下に示しました。チェックリストとして等、適宜ご利用ください。試薬の混合内容や装置設定など、プロトコル全工程の詳細に慣れるまでは16~40ページを必ずご覧ください。

Step	Summary of Conditions
Poly-A mRNA Enrichment	
Prepare and qualify RNA samples	Prepare 10–1000 ng total RNA in 25 µl nuclease-free water. Qualify integrity and adjust minimum RNA input as directed on 16 ページ
Denature and bind poly-A mRNA to oligo(dT) beads	25 µl total RNA sample + 25 µl Oligo(dT) Microparticles suspension Incubate in thermal cycler: 5 min @ 65°C, 1 min @ 4°C, Hold @ 4°C (RNA denaturation) Incubate 5 min at room temperature (bead binding)
Wash and elute bead-bound mRNA	Collect Oligo(dT) beads with magnetic stand, discard supernatant Wash beads with 200 µl Bead Washing Buffer Collect beads with magnetic stand, discard supernatant Resuspend beads with 25 µl Bead Elution Buffer Incubate in thermal cycler: 2 min @ 80°C, 1 min @ 4°C, Hold @ 4°C (RNA elution)
Re-bind poly-A mRNA to oligo(dT) beads	25 µl eluted RNA in Oligo(dT) bead suspension + 25 µl Bead Binding Buffer Incubate 5 min at room temperature (bead re-binding)
Wash and elute enriched mRNA	Collect Oligo(dT) beads with magnetic stand, discard supernatant Wash beads with 200 µl Bead Washing Buffer Collect beads with magnetic stand, discard supernatant Add 10 µl nuclease-free H ₂ O, retaining beads and liquid in sample well Keep on ice
RNA Fragmentation and cDNA Preparation	
Fragment mRNA and prime cDNA synthesis	10 µl bead-bound enriched poly-A mRNA+ 10 µl 2× Priming Buffer Incubate in thermal cycler: 4 min @ 94°C, 1 min @ 4°C, Hold @ 4°C Collect Oligo(dT) beads with magnetic stand, transfer 20 µl supernatant to fresh well
Synthesize first-strand cDNA	20 µl primed mRNA fragments + 8.5 µl First Strand Master Mix Incubate in thermal cycler: 10 min @ 25°C, 40 min @ 37°C, Hold @ 4°C

Step	Summary of Conditions
Synthesize second-strand cDNA	28.5 µl first-strand cDNA+ 25 µl Second Strand Enzyme Mix + 5 µl Second Strand Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 60 min @ 16°C, Hold @ 4°C
Purify cDNA	58.5 µl cDNA sample + 105 µl AMPure XP bead suspension Elute cDNA in 52 µl nuclease-free H ₂ O, removing 50 µl to fresh well Keep on ice
Library Prep	
Prepare Ligation master mix	Per reaction: 23 µl Ligation Buffer + 2 µl T4 DNA Ligase Keep at room temperature 30–45 min before use
Prepare End-Repair/dA-Tailing master mix	Per reaction: 16 µl End Repair-A Tailing Buffer + 4 µl End Repair-A Tailing Enzyme Mix Keep on ice
End-Repair and dA-Tail the DNA fragments	50 µl cDNA fragments + 20 µl End Repair/dA-Tailing master mix Incubate in thermal cycler: 15 min @ 20°C, 15 min @ 72°C, Hold @ 4°C
Ligate adaptor	70 µl DNA sample + 25 µl Ligation master mix +5 µl SureSelect XT HS2 RNA Adaptor Oligo Mix Incubate in thermal cycler: 30 min @ 20°C, Hold @ 4°C
Purify DNA	100 µl DNA sample + 80 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 35 µl nuclease-free H ₂ O, removing 34 µl to fresh well (For libraries from input RNA <100 ng RNA or RIN 6-8, do two serial purifications as directed on 33 ページ) Keep on ice
Prepare PCR master mix	Per reaction: 10 µl 5× Herculase II Reaction Buffer with dNTPs + 1 µl Herculase II Fusion DNA Polymerase Keep on ice
Amplify the purified DNA	34 µl purified DNA + 11 µl PCR master mix + 5 µl assigned SureSelect XT HS2 Index Primer Pair Amplify in thermal cycler using program on 36 ページ
Purify amplified DNA	50 µl amplified DNA + 50 µl AMPure XP bead suspension Elute DNA in 15 µl 1× Low TE Buffer.
Quantify and qualify DNA	Analyze quantity and quality using TapeStation, Bioanalyzer, or Fragment Analyzer System

G220489

SureSelect 製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120 - 477 - 111

Mail: email_japan@agilent.com

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く

9 : 00 ~ 12 : 00、13 : 00 ~ 17 : 00

※ SureSelect のプロトコル名とともに、テクニカルな質問と明示してください。

※ 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。