

Agilent SureSelect と KAPA Hyper Prep Kit の組み合わせによる 微量 DNA (10 ng) からの ライブラリ調製とキャプチャーシーケンス イルミナ用

適用アプリケーション: ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルから抽出された
DNA・血中循環セルフリー DNA

アプリケーションノート V2.5BJ (2015 年 5 月版)

非公式プロトコル & 参照データ

はじめに

注意: 本プロトコルはアジレント・テクノロジー社が正式にバリデーションしたプロトコルではありません。日本ジェネティクス社の KAPA Hyper Prep Kit とアジレント・テクノロジー社の SureSelect XT キットを組み合わせで使用する場合、参照プロトコルとしてご利用ください。ご使用されるサンプルによっては、プロトコルのさらなる最適化が必要となります点、ご了承ください。

注意: KAPA Hyper Prep Kit の販売、サポートは、日本ジェネティクス株式会社が行います。SureSelect キットの販売、サポートは、アジレント・テクノロジー株式会社が行います。それぞれのキットに関するご質問は、それぞれの会社のサポート窓口をご利用ください。

お願い: 本プロトコルは開発途上の参照プロトコルとなります。実サンプルに応用した場合の結果のフィードバック、改良点のご指摘などをぜひお寄せください。多くのご意見を反映させ、より優れたプロトコルの開発に努めてまいります。

本参照プロトコルでは、Agilent SureSelect XT のキャプチャライブラリ、ハイブリダイゼーション試薬、アダプターと PCR Primer を、KAPA Hyper Prep Kit と組み合わせ、次世代シーケンス用のキャプチャライブラリを調製するための操作手順を記述しています。KAPA 社からの推奨により、PCR Primer の使用量と PCR の条件が、2014 年 10 月版から Update されています。より少ない PCR サイクル数での実験が可能です。

ハイブリダイゼーション以降の操作手順は、アジレント・テクノロジー株式会社 SureSelect XT (ポストプール) ターゲットエンリッチメントシステム イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンス HiSeq/MiSeq 対応キット 和文プロトコル Version B.2 対応 [2015 年 5 月版 和文] を参照ください。また、KAPA BIOSYSTEMS 社の Technical Data Sheet, KAPA Hyper Prep Kit illumina platforms KR0961 – v1.14 も必ず合わせてご参照ください。



Agilent Technologies

実験に必要な試薬と機器

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

<http://AgilentGenomics.jp>

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 (ポストプール)						
SureSelect TE plus Adapter TPFD-KB (KAPA 等) , イルミナ, 96 反応	Agilent	931171	—	1	96 反応分	マルチプレックス対応。ライブラリ調製キットは含んでいません。16 反応分用については、別途お問い合わせください。
SureSelect TE plus Adapter TPFD-KB (KAPA 等) , イルミナ, 96 反応 , Auto	Agilent	931182	—	1	96 反応分	自動化用 Bravo NGS 自動化システムでの使用 (24 反応× 4 回分) に対応しています。
SureSelect XT キャプチャライブラリ (ベイト) キット						
SureSelect XT Human All Exon V5, 16 反応	Agilent	5190-6208	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5, 96 反応	Agilent	5190-6209	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs, 16 反応	Agilent	5190-6213	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs, 96 反応	Agilent	5190-6214	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+IncRNA, 16 反応	Agilent	5190-6446	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+IncRNA, 96 反応	Agilent	5190-6447	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5 Plus, 16 反応	Agilent	5190-6211	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5 Plus, 96 反応	Agilent	5190-6212	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory, 16 反応	Agilent	931071	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory, 96 反応	Agilent	931072	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Focused Exome, 16 反応	Agilent	5190-7787	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Focused Exome, 96 反応	Agilent	5190-7788	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Clinical Research Exome, 16 反応	Agilent	5190-7338	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Clinical Research Exome, 96 反応	Agilent	5190-7339	—	1	96 反応分	
ClearSeq SS Comprehensive Cancer, 16 反応	Agilent	5190-8011	—	1	16 反応分	
ClearSeq SS Comprehensive Cancer, 96 反応	Agilent	5190-8012	—	1	96 反応分	
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ, 16 反応	Agilent	5190-7518	—	1	16 反応分	
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ, 96 反応	Agilent	5190-7519	—	1	96 反応分	
ClearSeq SS DNA Kinome, 16 反応	Agilent	5190-4646	—	1	16 反応分	
ClearSeq SS DNA Kinome, 96 反応	Agilent	5190-4647	—	1	96 反応分	
SureSelect XT Mouse All Exon, 16 反応	Agilent	5190-4641	—	1	16 反応分	
SureSelect XT Mouse All Exon, 96 反応	Agilent	5190-4642	—	1	96 反応分	
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 16 反応	Agilent	5190-4806	—	1	16 反応分	再発注の場合、5190-4811
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 96 反応	Agilent	5190-4807	—	1	96 反応分	再発注の場合、5190-4812
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 16 反応	Agilent	5190-4816	—	1	16 反応分	再発注の場合、5190-4821
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 96 反応	Agilent	5190-4817	—	1	96 反応分	再発注の場合、5190-4822
SureSelect XT カスタム 3 - 5.9 Mb, 16 反応	Agilent	5190-4826	—	1	16 反応分	再発注の場合、5190-4831
SureSelect XT カスタム 3 - 5.9 Mb, 96 反応	Agilent	5190-4827	—	1	96 反応分	再発注の場合、5190-4832
SureSelect XT カスタム 6 - 11.9 Mb, 16 反応	Agilent	5190-4836	—	1	16 反応分	再発注の場合、5190-4841
SureSelect XT カスタム 6 - 11.9 Mb, 96 反応	Agilent	5190-4837	—	1	96 反応分	再発注の場合、5190-4842
SureSelect XT カスタム 12 - 24 Mb, 16 反応	Agilent	5190-4896	—	1	16 反応分	再発注の場合、5190-4901
SureSelect XT カスタム 12 - 24 Mb, 96 反応	Agilent	5190-4897	—	1	96 反応分	再発注の場合、5190-4902

その他の必要な試薬

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
その他の試薬						
KAPA Hyper Prep Kit	日本ジェネティクス (KAPA)	KK8502	指定	–	24 反応分	KK8500 : 8 反応用、KK8504 : 96 反応用もあります。
ヘラクレス (Herculase) II Fusion DNA Polymerase	Agilent	600677	指定	1 μ L	200 μ L	dNTP 溶液付きのタイプが必要です。大容量タイプ (600679 : 400 μ L) もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 μ L	2 mL	大容量タイプ (65602 : 10 mL, 65603 : 100 mL) もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	228 μ L	5 mL	大容量タイプ (A63881 : 60 mL, A63882 : 450 mL) もあります。
1xLow TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当	約 100 μ L	100 mL	
1 M Tris-HCl Buffer, pH 8.0	Sigma Aldrich	T3038	相当	約 0.2 μ L	1 L	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約 2.4 mL	500 mL	DEPC 処理ではないこと。
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	–	500 mL	98% 以上、分子生物学用グレード。他の有機溶剤のコンタミネーションがないこと。
80% および 70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade	–	–	–	1.8 mL	–	
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850	–	–	–	スタート時の gDNA をできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies	Q32851	–	–	–	BR アッセイでは感度が足りない gDNA をできるだけ正確に定量するために用います。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください。						
Agilent QPCR NGS ライブラリ定量キット (イルミナ GA)	Agilent	G4880A	推奨	1 ラン	5 ラン分	1 ランで最大 21 サンプルまで定量することができます。
※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ください。						
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	–	112 サンプル分
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	1 ラン	7 枚	1 枚で 16 サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	1 ラン	–	112 サンプル分
Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape	Agilent	5067-5365	推奨	1 ラン	7 枚	1 枚で最大 15 サンプル測定できます。
Agilent TapeStation Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	推奨	1 ラン	–	スタート時の gDNA の分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。
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 High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1 ラン	10 ラン分	1 ランで最大 11 サンプルまで流すことができます。エキスパートソフトウェア Ver B02.07 以降が必要です。

実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	内容量	備考
いずれかの電気泳動装置をご利用ください。						
Agilent 2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA/ G2965AA	指定	—	—	DNA の定性または定量に使用することができます。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定	—	—	DNA の定性または定量に使用することができます。 Expert Control Software ver B.02.07 以降が必要です
Covaris S-series Single Tube Sample Preparation System, Model S2	Covaris (エムエス機器)	Model S2	指定	—	—	Model E210, C-2000 でも可能、gDNA を再現性良く断片化するために必要。ネブライザの使用は推奨しません。
Covaris microTUBE with AFA fiber and snap cap	Covaris (エムエス機器)	520045	指定	—	—	Model S2 用
Qubit 2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨	—	—	スタート時の gDNA をできるだけ正確に定量するために用います。
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当	—	—	65°C 24h のハイブリで、27 µL の液が 24 µL 以下まで蒸発しないこと (HotTop 使用) 100 µL までの液量に対応していること。
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当	—	—	—
旋回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV-03	相当	—	—	磁気ビーズ溶液がチューブを上下してよく混ぜるように、旋回運動をするタイプのもの。別売りの専用チューブラック (WEB-03-12) と組み合わせると便利。
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当	—	—	45°C 以下の低温で、50 µL の DNA 溶液が 1~2 時間程度で濃縮できること。専用ロータ、冷却トラップ TU-500 と油回転真空ポンプ GLD-051 が必要です。
Dynal DynaMag-2	Life Technologies (ベリタス)	123-21D	相当	—	—	1.5 - 2 mL 遠心チューブ。16 本立ての磁気ビーズ用磁石スタンド。
日本ジェネティクス NGS MagnaStand (8 連チューブ用) または Dynal DynaMag-96 Side skirted (96 ウェルプレート用)	日本ジェネティクス または LifeTechnologies	8 連チューブ用 FGSSMAG2、 96 ウェルプレート用 120-27	相当	—	—	8 連チューブで実験をする場合、8 連チューブが独立して固定できるもの (日本ジェネティクス FGSSMAG2 など)。96 ウェルプレート用マグネットは、リング状に磁性ビーズが集まるタイプではなく、ウェルの一方に磁性ビーズが集まるタイプを推奨。
Mx3000P/Mx3005P 96-well tube plates または optical strip tubes	Agilent	410088 (Plate) または 410092 (Tube)	相当	Plate : 2 枚 Strip Tube : 4 連	Strip Tubes : 120 本 PCR Plate : 25 プレート	65°C 24h のハイブリで、27 µL の液が 24 µL 以下まで蒸発しないこと。
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	相当	キャップ : 4 連	strip caps : 120 本	65°C 24h のハイブリで、27 µL の液が 24 µL 以下まで蒸発しないこと。HotTop 対応のこと。

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/ 相当品	必要量	内容量	備考
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	4306311	相当	4 枚	100 films	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りますので、十分な注意とテストが必要です。65°C 24h のハイブリッドで、27 µL の液が 24 µL 以下まで蒸発しないこと。HotTop 対応のこと。
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。
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当	—	120 本	使用するサーマルサイクラに対応した消耗品をご使用ください。
DNA LoBind チューブ, 1.5 ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当	約 28 本	250 本	核酸の吸着が少ない LoBind タイプを使用してください。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856	—	—	—	Qubit で gDNA を正確に定量するために用います。
ピペット	Pipetman	P10, P20, P200, P1000	相当	—	—	—
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当	—	—	SureSelect のハイブリダイゼーションを多検体で同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、 エアロゾルブロックフィルター付き	—	—	—	—	—	—
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン 製、15 mL	アズワン	352097	相当	—	—	—
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly Clark	220, 330, 440 (S, M, L サイズ)	相当	—	—	—
アイスバケツ	—	—	—	—	—	—
タイマー	—	—	—	—	—	—
ボルテックスミキサー	—	—	—	—	—	—
卓上遠心器	日本ミリポア	チビタン II	相当	—	—	—
ヒートブロック (37°C)、 1.5 mL のチューブが入るタイプ	—	—	—	—	—	AM Pure XP ビーズによる精製ステップで使用します。
ウォータバス (WashBuffer2 の PreWarm 65°C)	—	—	相当	—	—	—
オプション品となります。必要に応じてご利用ください。						
Mx3005P リアルタイム定量 PCR システム	Agilent	401449	相当	—	—	キャプチャされた DNA ライブラリを正確に定量するために用います。

プロトコルの概略

本プロトコルでは KAPA の Hyper Prep Kit と、SureSelect 試薬キット (型番 931171 もしくは 931182) 中に含まれる SureSelect Adapter と指定の Primer を組み合わせて、キャプチャ前のアダプター付きライブラリ調製を行います。SureSelect のハイブリダイゼーションには、750 ng 以上のアダプター付きライブラリが必要です。

- ハイブリダイゼーションには、必ず SureSelect XT のキャプチャライブラリ (ベイト) と SureSelect XT 用の Blocker とハイブリダイゼーション試薬を使用してください。
- キャプチャ後のプロトコルは SureSelect XT の標準プロトコルに従います。SureSelect XT の標準プロトコルでは、キャプチャ後の PCR 増幅にヘラクレス (Herculase) II を使用しています。

このステップで、KAPA HiFi HotStart PCR 試薬が使用できる可能性があります。アジレントではテストしていません。KAPA HiFi HotStart PCR 試薬を使用される場合は、別途条件検討が必要となる可能性があります (アジレントのサポート対象外となります) ので、ご了承ください。

DNA の品質チェック

KAPA の Hyper Prep Kit では、全ゲノムシーケンス用のライブラリ調製として、1 ng の DNA からのスタート量がサポートされています。本キットとアジレントの SureSelect XT キャプチャライブラリを組み合わせてターゲットシーケンスを行う場合は、DNA の最低必要推奨量は 10 ng 以上です。また本プロトコルを FFPE サンプルに適用する場合、FFPE の品質によって、スタート量を最適化する必要があります。これまで、中～高品質の FFPE DNA の場合は、50 ng の出発 DNA 量、低品質の FFPE DNA の場合、200 ng の出発 DNA 量から、PCR Duplication % をある程度抑えたシーケンスがされている例が得られていません。FFPE から抽出した DNA の本プロトコルのための品質評価は、まだ最適化されていません。下記の資料をご参考いただき、適切な FFPE サンプルの品質評価法を検討いただく必要があることをご了承ください。

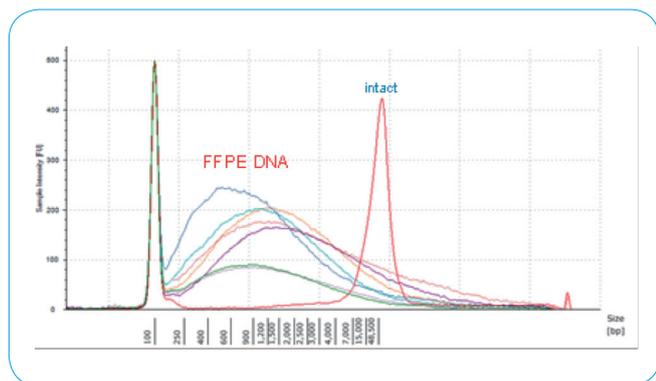
FFPE から抽出された DNA の品質評価： 一般的なガイドライン

- UV-VIS 260/280 の比が 1.7-2.0 の範囲内であること
- 500 - 1000 bp 以下まで分解が進むと、収量が低下し、ライブラリの複雑性に影響を与える
- Qubit/Nanodrop の濃度比が 0.35 以下になるサンプルは使用を避けた方が良い (dsDNA の量が不十分)
- 品質チェックのための qPCR アッセイを検討する必要がある

FFPE から抽出された DNA の品質評価のための参考資料 (本プロトコル用に最適化はされていません。)

- Optimizing FFPE DNA preparation for SureSelectXT2 (NOTE: guidelines in this application note for FFPE gDNA QC can also be used when working with SureSelectXT products)
Agilent Application Note Publication Number 5991-0960EN, 2012
- HaloPlex Target Enrichment from FFPE Tissues
Agilent Application Note Publication Number 5991- 0666EN, 2012
- FFPE-Derived DNA Quality Assessment In Preparation for HaloPlex Target Enrichment
Agilent protocol G9900-90050, 2013

gDNA の分解度をチェックするために、Agilent TapeStation の Genomic DNA Assay は有効な手法です。下記に、FFPE から抽出された DNA の分解度をチェックした例を示します。赤のラインが、Intact な gDNA のサイズ分布となり、その他の色のラインは各種 FFPE から抽出された DNA のサイズ分布を示します。



Genomic DNA Assay でチェックした結果、DNA の分解が激しい場合は、Agilent TapeStation の D1000 Assay もしくはバイオアナライザの DNA 1000 キットを用いて、分解度をより詳細に調べることを推奨します。分解の度合いによっては、下記のコバリスによる断片化の必要がない。もしくは、サイクル数を減らすなどの調整が必要です。

コバリスの条件の最適化については、コバリスを販売、サポートしているエムエス機器株式会社にお問い合わせください。

FFPE サンプルについては、分解度だけではなく、化学的な変性度合も考慮する必要があります。そのために、qPCR アッセイなどを検討する必要があります。(本プロトコルでは、この部分はまだ最適化されていません。ご了承ください。)

スタート DNA 量の目安

- 高品質 DNA 10 ng 以上
- セルフリー DNA 10 ng 以上
- 中～高品質の FFPE DNA 50 ng 以上
- 低品質の FFPE DNA 200 ng 以上

注意：スタート DNA 量は、以下の断片化のステップで若干失われます。20 - 40% 程度多めの量でスタートすることを推奨します。

DNA の断片化

1. DNA の吸着がおきない LoBind のチューブを用いて、Qubit で定量した 10 ng 以上の DNA を、1x LOW TE Buffer で、52 μ L の容量になるように希釈します。
2. アジレント SureSelect XT 和文プロトコル Version B.2 [2015 年 5 月版] を参照して、コバリスによる断片化を行います。ターゲットピークサイズは、150 - 200 bp です。高品質 DNA の場合のコバリス S220 の設定は下記のとおりです。断片化が進んだ DNA の場合の条件は、処理時間を短くするなどの検討が必要となります。

コバリス S220 の設定

設定	値
Duty Factor	10
Peak Power	175.0
Cycles / Burst	200
Treatment	360 sec
温度	4℃から 8℃

コバリス S2 の設定

設定	値
Duty Factor	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
時間	60 秒、6 サイクル
セットモード	Frequency sweeping
温度	4℃から 7℃

3. 断片化されたサンプル全量を、新しい PCR 用 8 Strip チューブもしくは PCR プレートに移します。
4. Qubit もしくは PicoGreen を用いて、断片化後の DNA 量を定量します。必要に応じて、出発 DNA 量を調整します。次の末端修復のステップには、50 μ L の断片化 DNA の液量が必要です。

キャプチャ用アダプター付き DNA ライブラリ調製

末端修復と A オーバーハング付加

1. 下記の表に従って、End Repair & A-Tailing 反応溶液を調製します。KAPA Hyper Prep Kit に含まれる試薬を使用します。

Component	Volume
Fragmented, double-stranded DNA	50 µL
End Repair & A-Tailing Buffer *	7 µL
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix *	3 µL
Total Volume	60 µL

*Buffer と Enzyme はプレミックス溶液を調製することができます。プレミックス溶液は、室温で 24 時間、4℃で 1 週間、-20℃で 3 か月間まで保存できます。

2. 液をピペッティングにより、よく混合します。
3. サーマルサイクラにセットし、下記の温度プログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は ON にしてください。

Step	Temperature	Time
End Repair & A- Tailing	20 °C	30 min
	65 °C	30 min
HOLD	4 °C	∞

4. すみやかに次のステップに移ります。ここで止めることはできません。

アダプターライゲーション

1. DNA のスタート量が 25 ng 未満の場合、使用する直前に、SureSelect Adapter OligoMix を Nuclease Free 水で適切な濃度に希釈します。SureSelect Adapter OligoMix の使用量については、下記の表を参照ください。

DNA スタート量	希釈	1 反応あたりの希釈液の使用量
50 ng ~ 1 µg	なし	5 µL
25 ng ~ 50 ng	1 : 1	5 µL
10 ng	1 : 5	5 µL

【 Note 】 DNA の出発量が 100 ng より多い場合には、SureSelect Adapter Oligo Mix の使用量を 10 µL まで増やす方が良好な結果が得られる可能性があります。(アジレントではテストしていません) SureSelect Adapter Oligo Mix を 10 µL まで増やして使用する場合は、Adapter Ligation 反応溶液作成時の Nuclease Free 水を足さずに、全体の反応液量は 110 µL に保つようにしてください。

2. 下記の表に従って、Adapter Ligation 反応溶液を調製します。KAPA Hyper Prep Kit に含まれる試薬と SureSelect Target Enrichment キットに含まれる試薬を使用します。

Component	Volume
End Repair & A-Tailing reaction product	60 µL
Nuclease Free 水 [†]	5 µL
Ligation Buffer [†]	30 µL
DNA Ligase [†]	10 µL
(diluted) SureSelect Adapter Oligo Mix	5 µL
Total Volume	110 µL

[†] Nuclease Free 水と Buffer と Enzyme はプレミックス溶液を調製することができます。プレミックス溶液は、室温で 24 時間、4℃で 1 週間、-20℃で 3 か月間まで保存できます。

3. 液をピペッティングにより、よく混合します。
4. サーマルサイクラにセットし、下記の温度プログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は OFF にしてください。前のステップと同一のサーマルサイクラを使用する場合、Hot Top の温度が下がっていることを確認してください。

Step	Temperature	Time
Ligation	20 °C	15 min

5. すみやかに次のステップに移ります。ここで止めることはできません。

ライゲーション後の精製

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。(AMPure XP ビーズは決して凍らせないようにしてください。)
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. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 88 μL を、新しい PCR チューブに入れます。前項で調製したライゲーション後の DNA サンプル 110 μL を同じチューブに加え、ピペティングでよく攪拌し、10 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3 ~ 5 分かかります。)
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、80% エタノール溶液を各チューブに 200 μL 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、80% エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 溶液が透明になるまで、そのまま 30 秒間静置します。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。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
9. チューブを磁石スタンドで 30 秒間静置した後、20 μL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
10. サンプルチューブを室温で 10 分間乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 10 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
11. 21 μL の elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0。濃度の濃いストックバッファをそのまま使わないように、バッファの濃度に注意してください。) を加え、ピペティングでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。
12. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 5 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
13. 上澄み液 20 μL を新しい PCR チューブに移します。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。

アダプター付き DNA ライブラリの増幅

1. 下記の表に従って、PCR 反応液を氷上で作製します。

Component	Volume
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µL
SureSelect Primer	4.0 µL
SureSelect ILM Indexing Pre Capture PCR Reverse Primer	4.0 µL
Adapter Ligated Library	20 µL
Total Volume	53 µL

2. ボルテックスで反応液をよく混ぜたのち、スピンドウンします。

3. 下表の PCR プログラムに従って、増幅を行います。

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98 °C	45 sec	1
Denaturation	98 °C	15 sec	DNA スタート量に応じて、必要最小限のサイクル数
Annealing	65 °C	30 sec	
Extension	72 °C	30 sec	
Final Extension	72 °C	1 min	1
HOLD	4 °C	∞	1

サイクル数の目安は DNA スタートサイズによって異なります。下表を参照してください。サンプルによっては、サイクル数を調整する必要が生じる可能性があります。

DNA スタート量	サイクル数
100 ng	6 - 7
50 ng	7 - 8
25 ng	8 - 10
10 ng	11 - 14

PCR Duplication の発生を最小限に抑えるため、PCR 増幅のサイクル数は必要最小限にするようにしてください。

PCR 増幅後の精製

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。(AMPure XP ビーズは決して凍らせないようにしてください。)
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. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 53 µL を、新しい PCR チューブに入れます。前項で増幅した PCR 後の DNA サンプル 53 µL を同じチューブに加ええます。ピペティングでよく攪拌し、10 分間インキュベーションします。
4. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3 ~ 5 分かかります。)
5. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、80% エタノール溶液を各チューブに 200 µL 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、80% エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
7. 溶液が透明になるまで、そのまま 30 秒間静置します。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。
8. 6 と 7 のステップをもう一度繰り返します。
9. チューブを磁石スタンドで 30 秒間静置した後、20 µL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
10. サンプルチューブを室温で 10 分間乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 10 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
11. 30 µL の Nuclease Free 水を加え、ピペティングでよく攪拌します。その後室温で 2 分間インキュベーションします。次の SureSelect のハイブリダイゼーションステップのため、ここでは Nuclease Free 水で溶出するようにしてください。
12. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 5 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
13. 上澄み液 約 30 µL を新しい PCR チューブに移します。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。

電気泳動による DNA サンプルの サイズチェックと定量

精製、増幅したアダプター付き DNA ライブラリのサイズと濃度をバイオアナライザ DNA1000 アッセイもしくは 2200 TapeStation を用いて測定します。

バイオアナライザの DNA 1000 チップと 試薬キットを使う場合

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ください。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.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
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、ラダーを調製します。
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、DNA1000 を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 225 bp-275 bp の位置にスミアな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。

【 NOTE 】

FFPE から抽出した DNA を用いた場合、この時点で下図のようなサブピークが観察されることがあります。これまでの経験では、このサブピークが出てもしーケンスの結果に悪影響を及ぼしていません。(このサブピークはキャプチャ後には消失します。) 下図のようなサブピークが得られた場合、サブピークも含めて積分し、ハイブリダイゼーション量を決定して次に進むことができると考えられます。

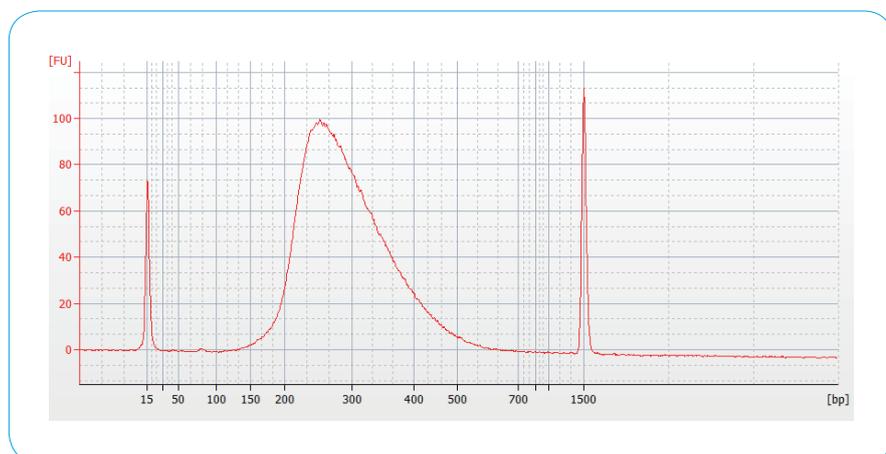
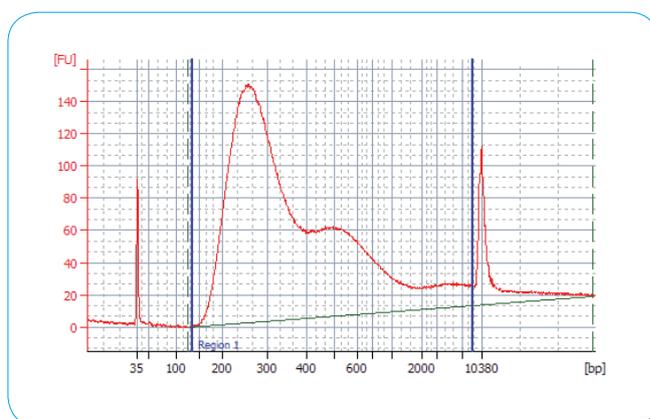


図 1 増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。225 bp-275 bp の位置に、スミアピークのピークトップが見られます。

2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合

NOTE

バイオアナライザの代わりに 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。

1. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備してください。増幅された DNA サンプルを 1 μ L 取り、D1000 sample buffer 3 μ L と混合します。

CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合してください。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

2. Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を 2200 TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。以下図の泳動図のような分布が得られ、225 bp から 275 bp 付近に DNA フラグメントの平均サイズがあることを確認します。

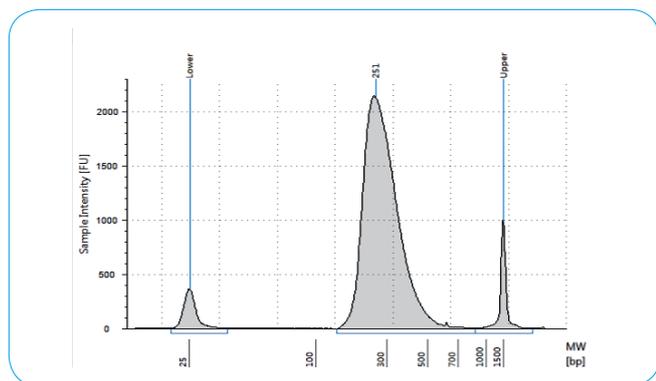


図2 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。225 bp - 275 bp の位置に、スメアピークのピークトップが見られます。FFPE サンプルの場合のピーク形状については、バイオアナライザの項の NOTE を参照ください。

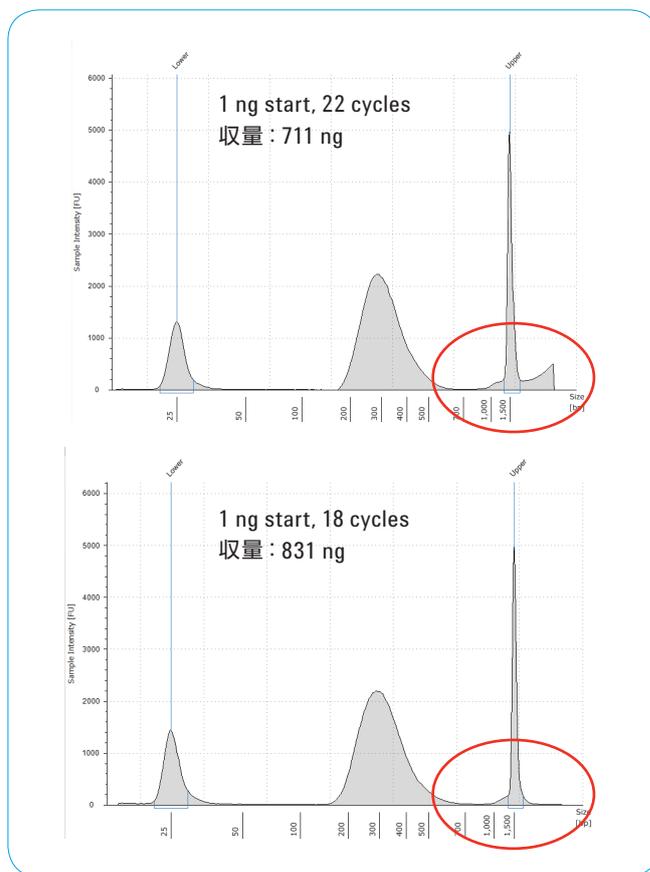


図3 2014年10月版の protocols を使用し、1 ng のスタート量の DNA を増幅したライブラリの泳動図。上図がキャプチャ前 PCR のサイクル数を 22 サイクルで、下図が 18 サイクルで実験を行った例です。22 サイクルの場合、収量が 18 サイクルの場合と比べて増えておらず Upper Marker の付近に、ヒシ状のセカンドピークが観察されています。このようなセカンドピークが Upper Marker の付近に観察される場合 PCR のサイクル数が多すぎる可能性があるため、サイクル数を減らしてお試しいただくことを推奨します。

【 NOTE 】

SureSelect のハイブリダイゼーションには、750 ng のアダプター付き DNA ライブラリが必要です。最低でも 500 ng 以上の量が必要です。(750 ng の方が望ましい。) また濃度は 221 ng/ μ L 以上である必要があります。濃度は 221 ng/ μ L より低い値が得られる場合が多いので、その時には濃縮遠心機を用いて、サンプルを濃縮してください。濃縮遠心を行う場合、45 $^{\circ}$ C 以上の高い温度をかけないようにしてください (トミー精工社の濃縮遠心機を使用する場合は、温度は Low, 40 $^{\circ}$ C で濃縮遠心します)。ハイブリダイゼーションに用いる量が 250 ng 以下になると、シーケンスの結果に悪影響を与えますので、先に進むことはお勧めできません。出発 DNA 量を増やすなどの操作で、750 ng 以上の収量を得るようにしてください。

ハイブリダイゼーション

得られたアダプター付き DNA ライブラリと SureSelect とのハイブリダイゼーションについては、SureSelect の標準プロトコルと全く同じ手順となります。

下記のプロトコルの P52 以降を参照ください。

アジレント SureSelect XT (ポストプール) ターゲットエンリッチメントシステム イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンス HiSeq/MiSeq 対応キット オンビーズ PCR 法対応和文プロトコル Protocol Version B.2 対応 [2015 年 5 月版和文]

参照データ

HapMap DNA NA12878 を用い、本プロトコルを適用してキャプチャ前のライブラリを作製した結果です。

スタート量	25 ng	10 ng	1 ng
アダプター希釈倍率	1 : 1	1 : 5	1 : 50
キャプチャ前 PCR の Cycle 数	9	12	19
キャプチャ前のアダプター付きライブラリの収量 (ng)	1,170 - 1,260	1,890 - 1,910	640 - 860

参考資料

日本ジェネティクス株式会社

Application Note 2014 <11>

アジレント・テクノロジー社 SureSelect XT ターゲットエンリッチメントシステムを用いた、微量 FFPE ゲノム DNA (50 ng) からのエクソームシーケンシング

KAPA BIOSYSTEMS 社製品に関するお問い合わせ窓口
日本ジェネティクス株式会社
<http://www.n-genetics.com>
TEL : 03-3813-0961
FAX : 03-3813-0962
E-mail : info@genetics-n.co.jp

SureSelect 製品に関するお問い合わせ窓口
アジレント・テクノロジー株式会社
<http://AgilentGenomics.jp/>
TEL : 0120-477-111
E-mail : email_japan@agilent.com

<http://AgilentGenomics.jp>

このアプリケーションノートに記載されている情報は研究目的のみの使用向けであり、診断目的には対応していません。このアプリケーションノートの情報、記述、および仕様は予告なく変更されることがあります。Agilent Technologies は本書に含まれる誤植、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Published in Japan, May. 11, 2015
5991-5756JAJP



Agilent Technologies