

イルミナ マルチプレックスシーケンスHiSeq/MiSeq対応に必要なもの

Agilent アプリケーションノート 5991-5756JAJP V2.5BJ

2015/07/17

(KAPA Hyper Prep Kit KR0961-v1.14, SureSelect XT Version B2対応)

※200ng以下の微量スタート用として、アジレント非公式の参照プロトコルとなります。実験においては、最適化が必要な場合があることをご承知ください。

※SureSelectは、キャプチャライブラリ(ペイト)とその他の試薬キットを別々に購入いただく構成となっています。必ず、試薬キットとキャプチャライブラリキットの両方をご購入ください。

この必要なものリストは、gDNAのQCおよび断片化をしてアダプタを付けてから、SureSelect XT試薬を用いて、ターゲット領域をキャプチャ、濃縮するまでの過程に必要な試薬と器具類をまとめたものです。シーケンシングに必要な物は、イルミナ社にお問い合わせください。

※指定: 必ず指定されたものをご使用ください。指定品以外を使用された場合は保証の対象外になります。

※推奨: 安定した結果を得るために、推奨品の使用をお奨めします。推奨品以外の製品を使用された場合、アプリケーションサポートの対象外になります。

※相当: コメント欄に記載された条件を満たすものなら、何を使用されてもかまいません。

<必要な試薬類>

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 Target Enrichment plus Adapter TPFD-KB ILM	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。自動化用は、下記931182をご準備ください。
SureSelect Target Enrichment plus Adapter TPFD-KB ILM (自動化用)	Agilent	931182	—	1	自動化 96反応分	Bravo NGS自動化システム対応
SureSelect XT キャプチャライブラリ(ペイト)キット						
SureSelect XT キャプチャライブラリ (ペイト)						
SureSelect XT Human All Exon V6, 16 反応	Agilent	5190-8863	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V6, 96 反応	Agilent	5190-8864	—	1	96反応分	自動化用は5190-8865
SureSelect XT Human All Exon V6+COSMIC, 16 反応	Agilent	5190-9307	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V6+COSMIC, 96 反応	Agilent	5190-9308	—	1	96反応分	自動化用は5190-9309
SureSelect XT Human All Exon V6+UTR, 16 反応	Agilent	5190-8881	—	1	16反応分	
SureSelect XT Human All Exon V6+UTR, 96 反応	Agilent	5190-8882	—	1	96反応分	自動化用は5190-8883
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	自動化用は5190-6210
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	自動化用は5190-6215
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	自動化用は5190-6448
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	自動化用は931073
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	自動化用は5190-7789
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	自動化用は5190-7344
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	自動化用は5190-4643
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 3.0 - 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 3.0 - 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 6.0 - 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 6.0 - 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 12.0 - 24.0 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 12.0 - 24.0 Mb, 96 反応	Agilent	5190-4897	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4902
ClearSeq キャプチャライブラリ (ペイト)						
SureSelect XT NCC oncopanel, 16反応	Agilent	931195	—	1	16反応分	
SureSelect XT NCC oncopanel, 96反応	Agilent	931196	—	1	96反応分	自動化用は931197
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	自動化用は5190-8013
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	自動化用は5190-7520

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	自動化用は5190-4648
KAPA Hyper Prep Kit	日本ジェネテイクス(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 uL	200 uL	dNTP溶液付きのタイプが必要です。大容量タイプ(600679,400uL)もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	228 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当	約 100 uL	100 mL	
1M Tris-HCl Buffer, pH 8.0	Sigma Aldrich	T3038	相当	約 0.2 uL	1 L	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約 2.4mL	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下さい。						
Agilent 2200 TapeStation消耗品						
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		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。

※ 各キットについて、それぞれの大容量タイプはご利用いただけます。

<必要な機器、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下さい。						
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。ネプ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、27µLの液が24µL以下まで蒸発しないこと (HotTop使用) 100µL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ざるように、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、50µL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。
Dynal DynaMag-2	Life Technologies (ベリタス)	123-21D	相当			1.5 - 2mL 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 FG-SSMAG2 (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 Life Technologies	8連チューブ用 FG-SSMAG2、 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 FG-SSMAG2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		Tube 120本 Plate 25枚	65°C 24hのハイブリで、27µLの液が24µL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、27µLの液が24µL以下まで蒸発しないこと。 HotTop対応のこと。
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当		120本	使用するサーマルサイクラーに対応した消耗品をご使用下さい
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るので、十分な注意とテストが必要です。 65°C24hのハイブリで、27µLの液が24µL 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。
DNA LoBind チューブ, 1.5ml 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	Kimberly Clark	220, 330, 440	相当			
SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)		(S, M, Lサイズ)				
アイスバケツ						
タイマー						
ポ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)、1.5mL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。