

# 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

## イルミナMiSeqシステム向け16SリボソームRNA遺伝子 アンプリコンの調製

はじめに	2
16Sライブラリー調製のワークフロー	5
アンプリコンPCR	6
PCRクリーンアップ	8
インデックスPCR	10
PCRクリーンアップ2	13
（オプション）ライブラリーの検証	15
ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリング	16
ライブラリーの変性およびMiSeqへのローディング	17
MiSeq Reporterのメタゲノムワークフロー	20
サポート情報	21

### 重要なお知らせ

この文書では、イルミナ社内で検証された特定のアプリケーションに関する情報を記載しています。このプロトコールは、イルミナ製品および非イルミナ製品を用いた手法として提供しておりますが、弊社が何らかの権利または保証を伴うものではありません。お客様がこの情報を使用または活用する場合は、それぞれの販売業者のライセンス条項に基づいて実施いただく必要があります。ここに記載したイルミナ製品は、特に記載がない限り研究での用途に限ります。お客様からのご意見・ご感想は頂戴いたしますが、このアプリケーションは弊社テクニカルサポート部およびフィールドアプリケーション部によるサポートの対象外となりますのでご了承ください。

## はじめに

メタゲノム研究は一般的に、原核生物の16SリボソームのRNA遺伝子（16SrRNA）解析により行われます。この遺伝子の長さはおよそ1,500bpで、保存領域間に可変領域が9つ散在しています。16SrRNAの可変領域は、多種多様な微生物叢を系統発生的に属や種などに分類するためによく用いられます。

16SrRNAのどの領域をシーケンス決定の対象とするかは議論になっていますが、実験の目的、設計、サンプルの種類次第で対象領域も様々です。このプロトコールでは、16SrRNA遺伝子のV3とV4の可変領域のシーケンス決定に必要な、サンプル調製の方法について説明します。このプロトコールは、別の領域に特異的なプライマーを使用すれば、他の領域のシーケンス解析にも使用できます。また、MiSeqに実装されたMiSeq ReporterまたはBaseSpace Sequence Hubによる一次解析および二次解析をプロトコールに組み入れ、16SrRNAアンプリコンシーケンスを決定する16S菌叢解析の包括的なワークフローを提供します。

### ワークフローの概要

- 1 アンプリコンプライマーの発注—このプロトコールにはV3-V4領域を増幅して1本の460bpのアンプリコンを生成するプライマーペアの配列が含まれます。プロトコールにはオーバーハングアダプターシーケンスも含まれ、イルミナのインデックスおよびシーケンスアダプターとの親和性を確保するため、プライマーペアのシーケンスに接合する必要があります。これらのプライマーはイルミナで直接販売していません。第三者サプライヤーに発注いただく必要があります。アンプリコンプライマーの詳細は、「アンプリコンプライマー」 (3ページ) を参照してください。
- 2 ライブラリーの調製—V3-V4領域を増幅する手順、少サイクルPCRにより、イルミナのシーケンスアダプターとデュアルインデックスバーコードをアンプリコンターゲットに追加する方法がプロトコールに説明されています。Nextera XTインデックスをすべて使用すると、最大96サンプルのライブラリーをまとめてプールしシーケンスすることができます。
- 3 MiSeqによるシーケンス—MiSeq v3試薬を使用した300 bpのペアエンドリードにより、各リードの終端が結合することで、V3-V4領域の高品質な全長リードが65時間のランで生成されます。1回のMiSeqランではおよそ2,000万リード以上作成されるため、96サンプルの同時解析では1サンプルあたり10万リード超のデータが得られます。これは、一般的なメタゲノム解析に十分なリード数です。
- 4 MSRまたはBaseSpace Sequence Hubによる解析—メタゲノムワークフローは、MiSeq Reporter (システムに搭載のソフトウェア) に第二解析オプションとして構築されており、あるいはBaseSpace Sequence Hub (クラウドベースソフトウェア) を介して使用することもできます。メタゲノムワークフローでは、Greengenesデータベースを用いて分類学的手法により分類が行われ、属または種レベルの分類がグラフ形式で表示されます。

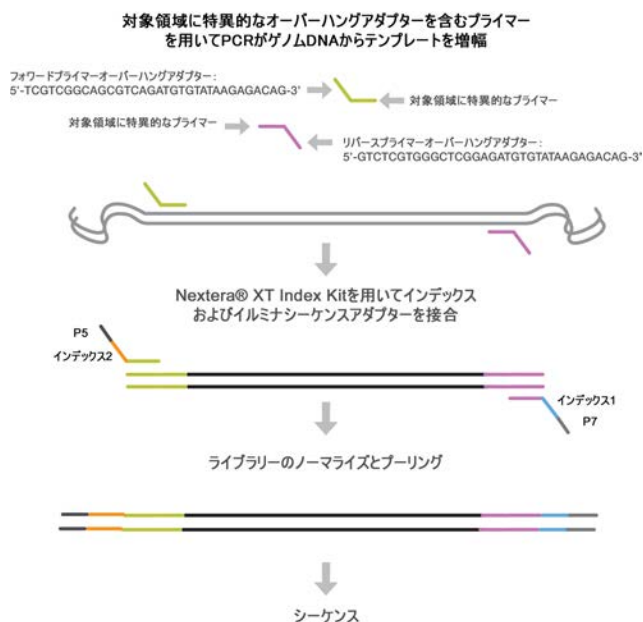
このプロトコールは、16SrRNA遺伝子の別の領域のシーケンスや他のターゲットアンプリコンシーケンスに使用することができます。16SrRNA以外のアンプリコンシーケンスにこのプロトコールを使用する際は、Generate FASTQワークフロー (第二解析オプション) を使用してください。詳細については、「MiSeq Reporterのメタゲノムワークフロー」 (20ページ) を参照してください。



### 免責事項

このイルミナの実証プロトコールに関する情報は、利便性を考慮し提供するものです。第三者のサプライヤーから試薬を購入することが必要な場合もあります。ただし、そのような試薬をプロトコールに使用した場合、製品の性能は保証せず技術サポートも限られます。

図1 16S V3-V4領域のアンプリコンワークフロー



ユーザーの指定する領域の上流と下流に設計されたオーバーハングアダプターを含むプライマーが、ゲノムDNAからテンプレートを増幅する際に使用されます。次に少サイクルPCRによる増幅が行われ、マルチプレックスインデックスとイルミナシーケンスアダプターが付加されます。v3試薬を用いてライブラリーのノーマライゼーションおよびプールした後、MiSeq V3試薬によりシーケンスを行います。

## アンプリコンプライマー

- このプロトコールで使用する遺伝子特異的シーケンスは、16S V3およびV4の領域をターゲットとします。このシーケンスは、Klindworthらの論文 (Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, et al. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res 41(1).) を基に、微生物プライマーで最も検出度が高いペアとして選定しました。遺伝子特異的シーケンスに、増幅された領域にイルミナアダプターの配列を付加します。この領域をターゲットとするプロトコールで使用するプライマーの全配列は、IUPACの標準塩基命名法により下記のように表されます。

16SアンプリコンPCRのフォワードプライマー=5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16SアンプリコンPCRのリバースプライマー=5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

- この方法は、ゲノムの他の領域をターゲットにする場合にも利用できます（他のプライマーセットによる16S領域または16S領域以外のゲノム、すなわちどのアンプリコンにも利用可能）。ターゲットにする領域に特異的なプライマーに、オーバーハングアダプターシーケンスを追加する必要があります（図1）。領域に特異的な配列に追加するイルミナのオーバーハングアダプターシーケンスは下記のとおりです。  
フォワードオーバーハング：5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[領域特異的配列]  
リバースオーバーハング：5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[領域特異的配列]
- 他の領域に特異的なプライマーを設計する場合は、下記の点を考慮するようお勧めします。
  - a ペアエンドリードでシーケンスを決定する場合、ターゲット領域から増幅したアンプリコンの中央でシーケンスがおおよそ50bp以上オーバーラップするよう設計することをお勧めします。一例として、2x300bpのペアエンドリードのランを行う場合、各リードの終端にあるシーケンス対象の塩基がオーバーラップするよう、インサートサイズを550bp以下とするようお勧めします。
  - b プライマーの領域に特異的な部分（オーバーハングシーケンスを除く）のアニーリング温度（T<sub>m</sub>）は、60°~65°Cにする必要があります。オンラインのPCRプライマーシーケンス解析ツール（<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>など）を使用し設計したプライマーの特性を確認することができます。T<sub>m</sub>のみを計算する場合は、領域特異的な配列のみを計算に使用する必要があります。ヘアピンおよびダイマーを確認する場合は、組み立てたプライマーシーケンス全体（オーバーハングを含む）を使用しなければなりません。
  - c オリゴプライマーセットを注文する際は、標準的な脱塩精製グレードを使用するようお勧めします。



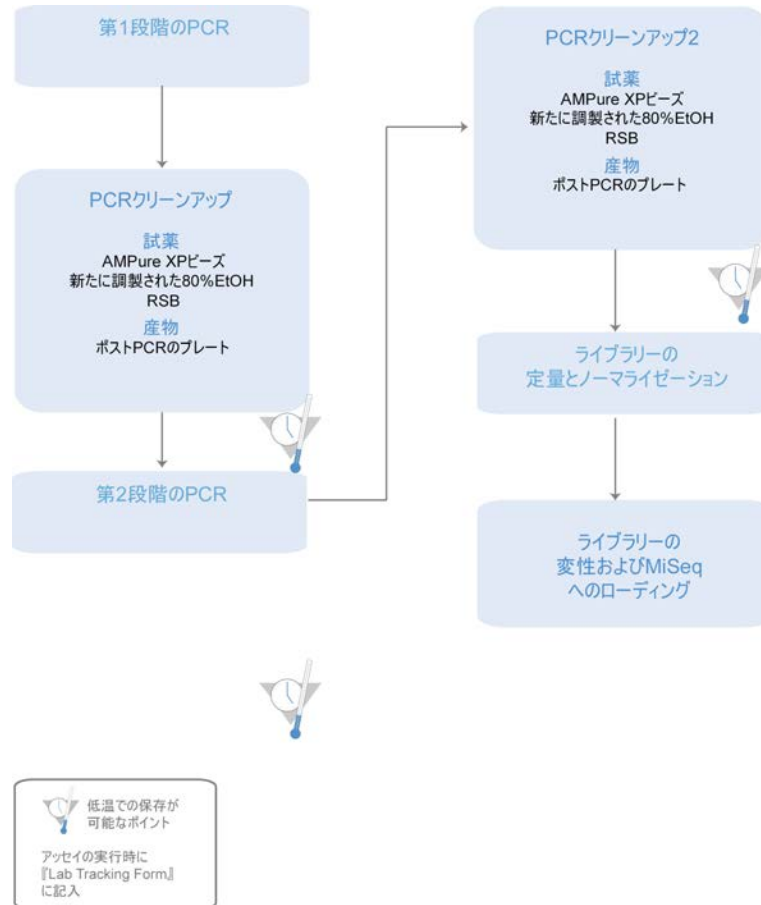
**注意**

このプロトコールに使用する試薬の詳細は、「消耗品および機器」（21ページ）を参照してください。

## 16Sライブラリー調製のワークフロー

下図に、16Sライブラリー調製プロトコルのワークフローを示します。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。

図2 16Sライブラリー調製のワークフロー



## アンプリコンPCR

この手順ではPCRにより、オーバーハングアダプターが接合した、対象領域に特異的なオーバーハング配列を含むプライマーを用いて、DNAサンプルからテンプレート領域を増幅します。プライマーシーケンスの詳細は、「アンプリコンプライマー」(3ページ)を参照してください。

### 消耗品



**注意**

このプロトコールに使用する消耗品および機器の詳細は、「消耗品および機器」(21ページ)を参照してください。

アイテム	数量	保管条件
微生物のゲノムDNA (10mM Tris-HCl (pH8.5) )	1サンプルあたり2.5 µL	-15°~-25°C
アンプリコンPCRリバープライマー (1 µM)	1サンプルあたり5 µL	-15°~-25°C
アンプリコンPCRフォワードプライマー (1 µM)	1サンプルあたり5 µL	-15°~-25°C
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	1サンプルあたり12.5 µL	-15°~-25°C
Microseal 「A」 粘着フィルム		
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
(オプション) バイオアナライザチップ (Agilent DNA1000キット：カタログ番号5067-1504)		

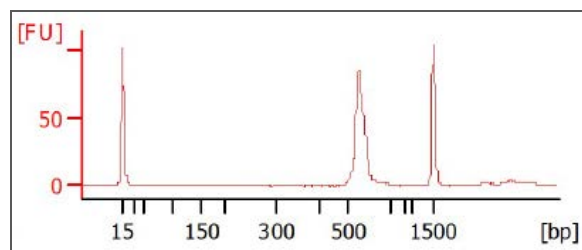
### 手順

- 1 下記のように、サンプルDNA、2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix、プライマーの反応を調製します。

	容量
微生物のDNA (5 ng/µL)	2.5 µL
アンプリコンPCRフォワードプライマー1 µM	5 µL
アンプリコンPCRリバープライマー1 µM	5 µL
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 µL
合計	25 µL

- 2 プレートにフィルムで蓋をした後、下記のプログラムを用いてサーマルサイクラーでPCRを行います。
- 95°C 3分間
  - 以下を25サイクル：
    - 95°C 30秒間
    - 55°C 30秒間
    - 72°C 30秒間
  - 72°C 5分間
  - 4°C ホールド
- 3 (オプション) Bioanalyzer DNA 1000チップでPCR産物を1  $\mu$ L分析し、サイズを確認します。V3とV4のプライマーペアをプロトコールで使用した場合、アンプリコンPCR後のバイオアナライザでの予想トレースサイズはおおよそ550bpです。

図3 アンプリコンPCR手順後のバイオアナライザトレースの例



## PCRクリーンアップ

この手順ではAMPure XPビーズを使用して16SV3とV4のアンプリコンを精製し、遊離プライマーとプライマーダイマーを取り除きます。

### 消耗品

アイテム	数量	保管条件
10 mM Tris pH8.5	1サンプルあたり52.5 µL	-15°~-25°C
AMPure XPビーズ	1サンプルあたり20 µL	2°~8°C
用時調製80%エタノール (EtOH)	1サンプルあたり400 µL	
96ウェル0.2 mL PCRプレート (オプション) Microseal 「B」 フィルム	1プレート	
(オプション) 96ウェルMIDIプレート	1プレート	

### 事前準備

- AMPure XP Beadsを室温に戻します。

### 手順

- 1 アンプリコンPCRプレートを20°C、1,000 × gで1分間遠心し、蓋についた水滴を集め、シールを慎重にはがします。
- 2 **(オプション-攪拌にシェーカーを使用する場合)** 25 µLにセットしたマルチチャンネルピペットを使用し、アンプリコンPCR産物の全量をPCRプレートからMIDIプレートに移します。サンプルごとにチップを交換します。



#### 注意

攪拌にシェーカーを使用する場合は、サンプルを96ウェルMIDIプレートに移します。ピペットで攪拌する場合は、サンプルは96ウェルPCRプレートに入れたままでかまいません。

- 3 AMPure XPビーズが均等に分散するよう30秒間ボルテックスします。処理するサンプルの数に応じて、適切な量のビーズをリザーバーに追加します。
- 4 マルチチャンネルピペットを使用し、20 µLのAMPure XPビーズをアンプリコンPCRプレートの各ウェルに添加します。カラムごとに、チップを交換してください。
- 5 96ウェルPCRプレートまたは密封プレートを使用する場合は、ピペットで丁寧に全量の吸引と吐出を10回繰返し、MIDIプレートを使用する場合は、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 6 CLPプレートを室温で5分間静置し、インキュベートします。
- 7 磁気スタンドにCLPプレートを2分間、または上清が透明になるまで置いておきます。
- 8 磁気スタンドにアンプリコンPCRプレートを置いたまま、マルチチャンネルピペッターを使用して上清を取り除き、廃棄します。サンプルごとにチップを交換します。



- 9 磁気スタンドにアンプリコンPCRプレートをしたまま、新しく調製した80%エタノールを用いて、下記の方法でビーズを洗浄します。
  - a マルチチャンネルピペットを使用して、新しく調製した80%エタノール200  $\mu$ Lを各サンプルウェルに添加します。
  - b 磁気スタンドにプレートをしたまま、30秒間インキュベートしてください。
  - c 上清を注意深く取り除き、廃棄します。
- 10 磁気スタンドの上にアンプリコンPCRプレートをしたまま、下記の方法で2度目のエタノール洗浄を行います。
  - a マルチチャンネルピペットを使用して、新しく調製した80%エタノール200  $\mu$ Lを各サンプルウェルに添加します。
  - b 磁気スタンドにプレートをしたまま、30秒間インキュベートしてください。
  - c 上清を注意深く取り除き、廃棄します。
  - d 細いピペットチップのP20マルチチャンネルピペットを使用して、余分のエタノールを取り除きます。
- 11 アンプリコンPCRプレートを磁気スタンドにをしたまま、ビーズを10分間風乾します。
- 12 アンプリコンPCRプレートを磁気スタンドから取り外します。マルチチャンネルピペットを使用し、10mM Tris-HCl (pH8.5) をアンプリコンPCRプレートの各ウェルに52.5  $\mu$ L追加します。
- 13 列ごとに先端部を交換し、ピペットで丁寧に吸引と吐出を10回繰り返します（またはプレートを密封し、1,800rpmで2分間攪拌します）。ビーズが完全に再懸濁していることを確認してください。
- 14 室温で2分間インキュベートします。
- 15 磁気スタンドの上にプレートを2分間、または上清が透明になるまで置いておきます。
- 16 マルチチャンネルピペットで、アンプリコンPCRプレートから新しい96ウェルPCRプレートに50  $\mu$ Lの上清を慎重に移します。クロスコンタミネーションを避けるために、サンプルごとにチップを交換してください。

**安全なストップポイント**

ただちに「インデックスPCR」に進まない場合、Microseal「B」粘着シールでプレートを密封し、-15°から-25°Cで保管してください（最長1週間）。

## インデックスPCR

この手順では、Nextera XT Index Kitを用いてデュアルインデックスおよびイルミナシーケンスアダプターを付加します。

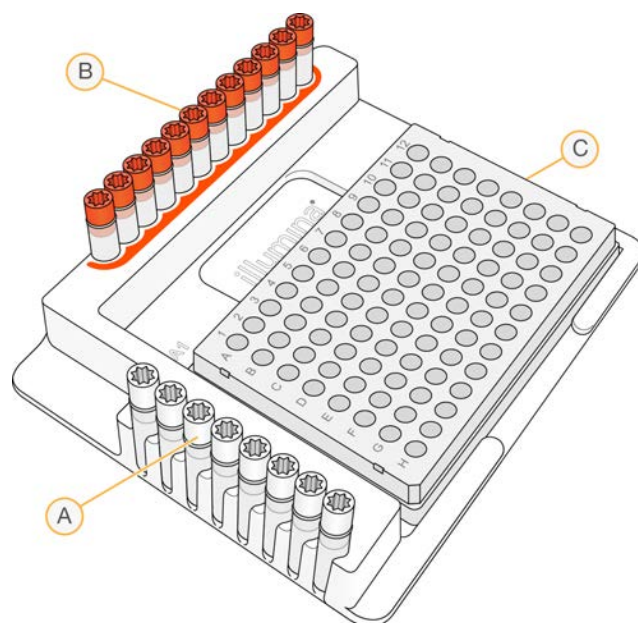
### 消耗品

アイテム	数量	保管条件
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	1サンプルあたり25 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
Nextera XT Index KitのNextera XTインデックス1プライマー (N7XX) (FC-131-1001またはFC-131-1002)	1サンプルあたり5 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
Nextera XT Index Kit (FC-131-1001またはFC-131-1002) のNextera XTインデックス2プライマー (S5XX)	1サンプルあたり5 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
PCRグレード水	1サンプルあたり10 $\mu$ L	
TruSeqインデックスプレートフィクスチャー (FC-130-1005)	1	
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
Microseal 「A」 粘着フィルム	1	

### 手順

- 1 マルチチャンネルピペットで、各ウェルから5  $\mu$ Lずつ採取し新しい96ウェルのプレートに移します。残りの45  $\mu$ Lはこのプロトコールで使用しませんので、他の用途で 사용할 ことができます。
- 2 必要に応じて下記のように、インデックス1と2のプライマーをラック (TruSeqインデックスプレートフィクスチャー) に配置します。
  - a インデックス2のプライマーチューブ (白いキャップ、透明な溶液) を、ラックがA~H行 (ラックの縦方向) に並ぶように配置します。
  - b インデックス1のプライマーチューブ (オレンジのキャップ、黄色い溶液) を、ラックが1~12列 (ラックの横方向) に並ぶように配置します。インデックスの選択に関する詳細は、「デュアルインデックスの原理」 (23ページ) を参照してください。

図4 TruSeqインデックスプレートフィクスチャー



- A インデックス2のプライマー (白いキャップ)
- B インデックス1のプライマー (オレンジのキャップ)
- C 96ウェルプレート

- 3 PCR産物が5 $\mu$ Lずつ各ウェルに入った96ウェルPCRプレートを、TruSeqインデックスプレートフィクスチャーにセットします。
- 4 下記のように、DNA、インデックス1と2のプライマー、2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix、PCRグレード水の反応を調製します。

	容量
DNA	5 $\mu$ L
NexteraXTインデックスプライマー1 (N7xx)	5 $\mu$ L
NexteraXTインデックスプライマー2 (S5xx)	5 $\mu$ L
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 $\mu$ L
PCRグレード水	10 $\mu$ L
合計	50 $\mu$ L

- 5 上下に10回丁寧にピペティングして混ぜ合わせます。
- 6 Microseal 「A」 でプレートをシールします。
- 7 20°Cでプレートを1,000xgで1分間遠心します。

**8** 以下のプログラムを使用して、サーマルサイクラーでPCRを実行します。

- 95°C 3分間
- 以下を8サイクル：
  - 95°C 30秒間
  - 55°C 30秒間
  - 72°C 30秒間
- 72°C 5分間
- 4°C ホールド

## PCRクリーンアップ2

この手順では、AMPure XPビーズを使用し定量前に最終ライブラリー産物を精製します。

### 消耗品

アイテム	数量	保管条件
10 mM Tris pH8.5	1サンプルあたり27.5 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
AMPure XPビーズ	1サンプルあたり56 $\mu$ L	2 $^{\circ}$ ~8 $^{\circ}$ C
用時調製80%エタノール (EtOH)	1サンプルあたり400 $\mu$ L	
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
(オプション) Microseal 「B」 フィルム		
(オプション) 96ウェルMIDIプレート	1プレート	

### 手順

- 1 インデックスPCRプレートを20 $^{\circ}$ C、280  $\times$  gで1分間遠心し、蓋についた水滴を集めます。
- 2 **(オプション-攪拌にシェーカーを使用する場合)** 50  $\mu$ Lにセットしたマルチチャンネルピペットを使用し、インデックスPCR産物の全量をPCRプレートからMIDIプレートに移します。サンプルごとにチップを交換します。



#### 注意

攪拌にシェーカーを使用する場合は、サンプルを96ウェルMIDIプレートに移します。ピペットで攪拌する場合は、サンプルは96ウェルPCRプレートに入れたままでかまいません。

- 3 AMPure XPビーズが均等に分散するよう30秒間ボルテックスします。マルチチャンネルピペットを使用する場合は、適切な容量のビーズをリザーバーに添加します。
- 4 マルチチャンネルピペットを使用し、56  $\mu$ Lの懸濁したAMPure XPビーズをインデックスPCRプレートの各ウェルに添加します。
- 5 96ウェルPCRプレートを使用する場合は、丁寧に10回ピペッティングを行い、MIDIプレートを使用する場合は、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 6 CLPプレートを室温で5分間静置し、インキュベートします。
- 7 磁気スタンドにCLPプレートを2分間、あるいは上清が透明になるまで置きます。または上清が透明になるまで置いておきます。
- 8 磁気スタンドにインデックスPCRプレートを置いたまま、マルチチャンネルピペッターを使用して上清を取り除き、廃棄します。サンプルごとにチップを交換します。

- 9 磁気スタンドにインデックスPCRプレートをしたまま、新しく調製した80%エタノールを用いて、下記の方法でビーズを洗浄します。
- a マルチチャンネルピペットを使用して、新しく調製した80%エタノール200  $\mu$ Lを各サンプルウェルに添加します。
  - b 磁気スタンドにプレートをしたまま、30秒間インキュベートしてください。
  - c 上清を注意深く取り除き、廃棄します。
- 10 磁気スタンドの上にインデックスPCRプレートをしたまま、下記の方法で2度目のエタノール洗浄を行います。
- a マルチチャンネルピペットを使用して、新しく調製した80%エタノール200  $\mu$ Lを各サンプルウェルに添加します。
  - b 磁気スタンドにプレートをしたまま、30秒間インキュベートしてください。
  - c 上清を注意深く取り除き、廃棄します。
  - d 細いピペットチップのP20マルチチャンネルピペットを使用して、余分のエタノールを取り除きます。
- 11 インデックスPCRプレートを磁気スタンドにをしたまま、ビーズを10分間風乾します。
- 12 インデックスPCRプレートを磁気スタンドから取り外します。マルチチャンネルピペットを使用し、10mM Tris-HCl (pH8.5) をインデックスPCRプレートの各ウェルに27.5  $\mu$ L追加します。
- 13 96ウェルPCRプレートを使用する場合は、ビーズが完全に懸濁するまで丁寧に10回ピペティングを行い、列ごとに先端部を交換します。MIDIプレートを使用する場合は、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 14 室温で2分間インキュベートします。
- 15 磁気スタンドの上にプレートを2分間、または上清が透明になるまで置いておきます。
- 16 マルチチャンネルピペットで、インデックスPCRプレートから新しい96ウェルPCRプレートに25  $\mu$ Lの上清を慎重に移します。クロスコンタミネーションを避けるために、サンプルごとにチップを交換してください。

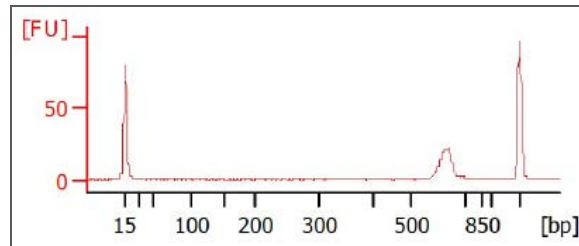
**安全なストップポイント**

「ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリング」(16ページ)に進まない場合、Microseal「B」粘着シールでプレートを密封してください。-15°から-25°Cで保管してください(最長1週間)。

## (オプション) ライブラリーの検証

1 : 50に希釈した最終ライブラリー1  $\mu$ LをBioanalyzer DNA 1000チップに乗せ、ランを実行しサイズを検証します。V3とV4のプライマーペアをプロトコールで使用した場合、アンプリコンPCR手順後のバイオアナライザでの予想トレースサイズはおよそ630 bpです。

図5 バイオアナライザでの最終ライブラリーのトレースの例



## ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリング

ライブラリーの定量には、二本鎖DNA特異的なダイを使用する蛍光定量法を用いるようお勧めします。

Agilent Technologies 2100 バイオアナライザのトレースで確認したDNAアンプリコンのサイズに基づき、DNA濃度をnM単位で算出します。

$$\frac{(\text{濃度 (ng/}\mu\text{L)})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{平均ライブラリーサイズ})} \times 10^6 = \text{濃度 (nM)}$$

例えば：

$$\frac{15 \text{ ng/}\mu\text{L}}{(660 \text{ g/mol} \times 500)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Resuspension Buffer (RSB) または10mM Tris pH8.5を用いて、最終ライブラリーの濃度を4 nMに希釈します。各ライブラリーから希釈DNAを5 $\mu$ L分取し、独立したインデックスのライブラリーを一つに混合します。必要なリード数に応じて、最大96個のライブラリーを1回のMiSeqランにプールすることができます。

メタゲノムサンプルでは、サンプルごとのリード数が10万超であれば、微生物組成の解析に十分です。このリード数であれば、MiSeqの出力リード数が2千万超と仮定すると、最大レベルの96個のライブラリーまでサンプルをプールすることができます。



## ライブラリーの変性およびMiSeqへのローディング

クラスターを形成しシーケンスを実施するための準備として、プールされたライブラリーをNaOHで変性しハイブリダイゼーションバッファーで希釈します。次に、熱による変性を行いMiSeqにロードします。（ランのクオリティーを補正するために）塩基の多様性が低い内部標準としてPhiXを、それぞれのランで5%以上添加する必要があります。MiSeq V3試薬キットを使用すると、より良いメトリックスでのランが可能です。

### 消耗品

アイテム	数量	保管条件
10 mM Tris pH8.5またはRSB (Resuspension Buffer)	6 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
HT1 (Hybridization Buffer)	1540 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
0.2 N NaOH (1週間以内に調製したもの)	10 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
PhiXコントロールキットv3 (FC-110-3001)	4 $\mu$ L	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
MiSeq 試薬カートリッジ	1 カートリッジ	-15 $^{\circ}$ ~-25 $^{\circ}$ C
容量1.7 mLのマイクロ遠心チューブ (スクリーキャップを推奨)	3チューブ	
容量2.5 Lのアイスバケット		

### 事前準備

- 1 1.7 mLのマイクロ遠心チューブに適合したヒートブロックを96 $^{\circ}$ Cに設定します。
- 2 -15~-25 $^{\circ}$ Cの冷凍庫からMiSeq試薬カートリッジを取り出し、室温で解凍します。
- 3 容量2.5 L程度の容器で氷と水を3対1の割合で混ぜたアイスウォーターバスを用意します。

### DNAの変性

- 1 プールされた最終DNAライブラリーと、用事調製した0.2 N NaOHを下記の分量ずつマイクロ遠心チューブで混ぜ合わせます。
  - 4 nMのプールされたライブラリー (5  $\mu$ L)
  - 0.2 N NaOH (5  $\mu$ L)
- 2 残りの0.2 N NaOH希釈液は取っておき、PhiXコントロールの調製に使用します（希釈後12時間以内）。
- 3 軽くボルテックスしてサンプルを混合し、20 $^{\circ}$ C、280  $\times$  gで1分間遠心します。
- 4 DNAを一本鎖に変性させるために、室温で5分間インキュベートします。

## 5 変性DNAの入ったチューブに下記の分量の氷冷HT1を追加します。

- 変性DNA (10  $\mu$ L)
- 氷冷HT1 (990  $\mu$ L)

HT1を追加すると、1 mMのNaOH中に20 pMの変性ライブラリーが含まれることとなります。

## 6 最後の希釈のステップまで、変性DNAを氷の上に置いておきます。

### 変性DNAの希釈

#### 1 次の表を使用して、変性DNAを希望の濃度に希釈します。



#### 注意

MiSeq v3試薬を用いて、生クラスター密度を800~1,000 K/mm<sup>2</sup>にするようお勧めします。4 pMのローディング濃度で1回目のランを始め、後続のランで濃度を適宜調整するようお勧めします。

最終濃度	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pMの変性ライブラリー	60 $\mu$ L	120 $\mu$ L	180 $\mu$ L	240 $\mu$ L	300 $\mu$ L
氷冷HT1	540 $\mu$ L	480 $\mu$ L	420 $\mu$ L	360 $\mu$ L	300 $\mu$ L

#### 2 数回転倒混和させて、DNA溶液を軽く遠心します。

#### 3 変性希釈したDNAを氷の上に置きます。

### PhiXコントロールの変性と希釈

下記の手順に従い、10 nM PhiXライブラリーのローディング濃度がアンプリコンライブラリーと同じになるよう変性と希釈を行います。ライブラリーの最終混合物にPhiXが5%以上含まれている必要があります。

#### 1 下記の分量を混ぜ合わせ、PhiXライブラリーを4 nMに希釈します。

- 10 nM PhiXライブラリー (2  $\mu$ L)
- 10 mM Tris pH 8.5 (3  $\mu$ L)

#### 2 4 nM PhiXと0.2 N NaOHを以下の分量ずつ遠心チューブ内で混ぜ合わせます。

- 4 nM PhiXライブラリー (5  $\mu$ L)
- 0.2 N NaOH (5  $\mu$ L)

#### 3 2 nM PhiXライブラリー溶液を混ぜるために、軽くボルテックスします。

#### 4 PhiXライブラリーを一本鎖に変性させるため、室温で5分間インキュベートします。

#### 5 20 pM PhiXライブラリーになるように、あらかじめ冷やしておいた以下の分量のHT1を、変性PhiXライブラリーを含むチューブに加えます。

- 変性PhiXライブラリー (10  $\mu$ L)
- 氷冷HT1 (990  $\mu$ L)

- 6 下表に従い、20 pM PhiXライブラリーが、アンプリコンライブラリーと同じローディング濃度になるよう希釈変性します。

最終濃度	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pMの変性ライブラリー	60 µL	120 µL	180 µL	240 µL	300 µL
氷冷HT1	540 µL	480 µL	420 µL	360 µL	300 µL

- 7 数回転倒混和させて、DNA溶液を軽く遠心します。  
 8 変性希釈したPhiXを氷の上に置きます。

## アンプリコンライブラリーとPhiXコントロールの混合



### 注意

ソフトウェアのバージョンがRTA v1.17.28以降（MCS v2.2に同梱）の場合、塩基の多様性が低いライブラリーではPhiXコントロールのスパイクイン濃度を5%以上にするようお勧めします。性能を最大に発揮できるようにするには、ソフトウェアをv3（MCS 2.3）に更新してください。旧バージョンのMiSeqソフトウェアを使用の場合やGAまたはHiSeqでこれらのライブラリーのシーケンス決定を行う場合は、PhiXコントロールのスパイクイン濃度を25%以上にするようお勧めします。

- 変性PhiXコントロールライブラリーと変性アンプリコンライブラリーを、下記の分量ずつマイクロ遠心チューブ内で混ぜ合わせます。
  - 変性希釈PhiXコントロール（30 µL）
  - 変性希釈アンプリコンライブラリー（570 µL）
- サンプルライブラリーとPhiXコントロールの混合物は、熱変性を行い（3.の操作）MiSeq v3試薬カートリッジにローディングする準備が整うまで、氷にのせておきます。
- ヒートブロックを用いて、ライブラリーとPhiXコントロールの混合物が入ったチューブを96°Cで2分間インキュベートします。
- インキュベート後、チューブを1~2回転倒混和して混ぜ合わせ、ただちにアイスウォーターバスに入れます。
- アイスウォーターバス内でチューブを5分間氷冷します。



### 注意

MiSeqフローセルにテンプレートを効率的にローディングできるように、ライブラリーは、熱変性後ただちにMiSeq試薬カートリッジにローディングしてください。

## MiSeq Reporterのメタゲノムワークフロー

サンプルのローディング後、MiSeq Reporterソフトウェア（MSR）を用いて二次解析がMiSeqシステム上で行われます。MSRには、MiSeqシーケンスデータを解析するための各種のオプションが用意されています。この（実証）16Sプロトコールでは、メタゲノムワークフローを使用します。

16Sメタゲノムワークフローに従うと、16SrRNAデータのデータベースを用いてV3およびV4のアンプリコンから微生物が分類されます。この分類はGreengenesデータベース（<http://greengenes.lbl.gov/>）に基づいています。ワークフローでは、各種の分類学的なレベル（界、門、綱、目、科、属、種）でリードの分類が出力されます。解析には下記の内容が含まれます。

- クラスタグラフ-生クラスターの数、フィルターを通過するクラスター、アラインされなかったクラスター、インデックスを伴わないクラスター、重複したクラスター
- サンプルテーブル-各サンプルのシーケンス決定の結果
- クラスタパイチャート-各サンプルの分類内訳のグラフ表示

詳細な説明およびガイダンスは、『MiSeq Reporter Metagenomics Workflow – Reference Guide』（文書番号15042317）を参照してください。

この16Sメタゲノムプロトコールに記載の方法は、ウィルス研究、変異検出、他の微生物関連の研究に関連するいずれのターゲットアンプリコンのシーケンス決定にも使用することができます。他のターゲットアンプリコンのシーケンス研究にこのプロトコールを使用する場合、MiSeq Reporter Generate FASTQワークフローを選択してFASTQファイルを装置で生成し、下流の解析に利用してください。Generate FASTQワークフローの個別項目のガイダンスは、『MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow – Reference Guide』（文書番号15042322）を参照してください。

## サポート情報

このプロトコルを実施するに当たり必要な情報、および準備品について下記に記しています。

### 略語

表1 略語

略語	定義
HT1	ハイブリダイゼーションバッファー
IEM	Illumina Experiment Manager
MSR	MiSeq Reporter
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	リボソーム RNA (Ribosomal RNA)
RSB	Resuspension Buffer

### 消耗品および機器

サンプルを調製する前に、ユーザーが用意する必要な消耗品と器具がすべて揃っていることを点検して確認してください。

表2 ユーザーが用意する消耗品

消耗品	サプライヤー
1.7 mLマイクロ遠心チューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 $\mu$ Lフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 $\mu$ Lマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
10 $\mu$ Lシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ Lフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ Lマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ Lシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ Lフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ Lマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ Lシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 $\mu$ Lフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー

消耗品	サプライヤー
1000 $\mu$ Lマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 $\mu$ Lシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
96 ウェル0.2 mLスカートレスPCRプレート または Twin.Tec96ウェルPCRプレート	BIO-RAD、パーツ番号 MSP-9601
Agencourt AMPureXP 60 mLキット	Beckman Coulter Genomics、 パーツ番号A63881
分子生物学用保証付きエタノール200 (無水エタノール) (500 mL)	Sigma-Aldrich、パーツ番号E7023
アンプリコンPCRフォワードプライマー (標準脱塩)	
アンプリコンPCRリバースプライマー (標準脱塩)	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	KAPA Biosystems、パーツ番号：KK2601
Microseal 「A」 粘着シール	Bio-Rad、パーツ番号MSA-5001
Microseal 「B」 粘着シール	Bio-Rad、パーツ番号MSB-1001
MiSeq Reagent Kit v3 (600 サイクル)	イルミナ、カタログ番号MS-102-3003
Nextera XT Index Kit	イルミナ、カタログ番号FC - 131 - 1001 または イルミナ、カタログ番号FC - 131 - 1002
PhiX Control Kit v3	イルミナ、カタログ番号FC - 110 - 3001
PCRグレード水	一般的なラボ用品サプライヤー
dsDNA結合性色素試薬による蛍光定量的な定量	一般的なラボ用品サプライヤー
RNase/DNase フリーの8 ウェルPCRストリップチューブとキャップ	一般的なラボ用品サプライヤー
RNase/DNaseフリーのマルチチャンネル試薬リザーバー、ディスポーザブル	VWR、パーツ番号 89094-658
Tris-HCl 10 mM、pH 8.5	一般的なラボ用品サプライヤー
(オプション) 96ウェル保管プレート、ラウンドウェル、0.8 mL (「MIDI」プレート)	Fisher Scientific、パーツ番号AB-0859

表3 ユーザーが用意する機器

機器	サプライヤー
容量2.5Lのアイスバケット	一般的なラボ用品サプライヤー

機器	サプライヤー
96ウェルサーマルサイクラー (ヒートリッド付き)	一般的なラボ用品サプライヤー
二本鎖DNA特異的なダイを使用した 定量に使用する蛍光光度計	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド-96	Life Technologies、カタログ番号AM10027
マイクロプレート遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
TruSeqインデックスプレートフィクスチャー キット (再利用可能)	イルミナ、カタログ番号FC - 130 - 1005
(オプション) 2100 Bioanalyzer Desktop System	アジレント、パーツ番号G2940CA
(オプション) Agilent DNA 1000 Kit	アジレント、パーツ番号5067-1504
(オプション) 高速マイクロプレートシェー カー	VWR、カタログ番号13500-890 (110V/120V) または VWR、カタログ番号14216-214 (230V)

## デュアルインデックスの原理

デュアルインデックスの方法では、2つの8塩基のインデックス配列、P7シーケンスに隣接しているインデックス1 (i7)、およびP5シーケンスに隣接しているインデックス2 (i5)を使用します。デュアルインデックスは各サンプルに独立したインデックス1 (i7) およびインデックス2 (i5)を追加することで有効化されます。96サンプルNextera XT Index Kit (FC-131-1002)では、12個の異なるインデックス1 (i7) アダプター (N701~N712) と8個の異なるインデックス2 (i5) アダプター (S501~S508) が使用されます。24サンプルNextera XT Index Kit (FC-131-1001) では、6個の異なるインデックス1 (i7) アダプター (N701~N706) と4個の異なるインデックス2 (i5) アダプター (S501~S504) が使用されます。インデックスアダプター名では、NまたはSはNextera XTのサンプル調製を、7または5はインデックス1 (i7) またはインデックス2 (i5) をそれぞれ意味します。01~12はインデックス番号を指します。サンプルのデマルチプレクスを行うためのサンプルシートを生成するためのインデックスシーケンスのリストを次に示します。

インデックス1 (i7)	シーケンス	インデックス2 (i5)	シーケンス
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

## 低ブレックスプールのガイドライン

MiSeq/HiSeqにおいては、G/Tのシーケンスには緑色のレーザーまたはLED、A/Cのシーケンスには赤色のレーザーまたはLEDが使用されます。適切に登録されるよう、各カラーチャンネルに該当する2つのヌクレオチドのうち少なくとも1つが各サイクルごとに読み込まれます。シーケンスが行われるインデックスリードの各塩基に対して、カラーバランスを維持することが大切です。維持できないと、インデックスリードのシーケンスは、うまく塩基が割り当てられず、クオリティーが低くなるおそれがあります。デュアルインデックスシーケンスを選択した場合には、インデックスそれぞれ（インデックス1とインデックス2）に、かならず独立したバーコードペアを少なくとも2つ使用してください。次のテーブルは、可能なプール方式を示しています。

**表4** プーリングされるライブラリーの数：6以下、シーケンスワークフロー：シングルインデックス

ブレックス	インデックス1 (i7) 選択	インデックス2 (i5) 選択
1ブレックス (プーリングなし)	任意のインデックス1アダプター	任意のインデックス2アダプター
2ブレックス	<ul style="list-style-type: none"> <li>（オプション1） N702および N701</li> <li>（オプション2） N702および N704</li> </ul>	
3ブレックス	<ul style="list-style-type: none"> <li>（オプション1） N701、N702およびN704</li> <li>（オプション2） N703、N705およびN706</li> </ul>	
4ブレックスまたは5ブレックス	<ul style="list-style-type: none"> <li>（オプション1） N701、N702、N704、および他の任意のインデックス1アダプター</li> <li>（オプション2） N703、N705、N706、および他の任意のインデックス1アダプター</li> </ul>	
6ブレックス	N701、N702、N703、N704、N705およびN706	

**表5** シーケンスワークフロー。シングルまたはデュアルインデックス

ブレックス	インデックス1 (i7) 選択	インデックス2 (i5) 選択
7~12ブレックス、デュアルインデックス	<ul style="list-style-type: none"> <li>（オプション1） N701、N702、N704、および他の任意のインデックス1アダプター（必要に応じて）</li> <li>（オプション2） N703、N705、N706、および他の任意のインデックス1アダプター（必要に応じて）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>（オプション1） S501 および S502</li> <li>（オプション2） S503 および S504</li> <li>（オプション3） S505 および S506</li> </ul>



ブレイクス	インデックス1 (i7) 選択	インデックス2 (i5) 選択
7~12ブレイクス、シングルインデックス (96サンプル Nexteraインデックスアダプターキット)	<ul style="list-style-type: none"> <li>N701-N706、および他の任意のインデックス1アダプター (必要に応じて)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>任意のインデックス2 (i5) アダプター</li> </ul>
12ブレイクスを超える場合	N701、N702、N703、N704、N705、N706、および任意の他のインデックス1アダプター	<ul style="list-style-type: none"> <li>(オプション1) S501、S502、および任意の他のインデックス2アダプター (必要に応じて)</li> <li>(オプション2) S503、S504、および任意の他のインデックス2アダプター (必要に応じて)</li> <li>(オプション3) S505、S506、および任意の他のインデックス2アダプター (必要に応じて)</li> </ul>

上記の方法は、受け入れ可能な組み合わせのうちの一部だけを示しています。もしくは、各インデックスの実際のシーケンスを表で確認し、それぞれの塩基位置で、インデックスリード用のカラーチャンネルのどちらの色もシグナルとして検出されることを確認してください。

好ましい				好ましくない			
インデックス1		インデックス2		インデックス1		インデックス2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGGCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGGCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√ xxxx

√=両色でのシグナル  
x=1色チャンネルでのシグナル欠損

## PCR産物のコンタミネーションの防止

特異的なDNAシーケンスの増幅には、通常PCR法が用いられます。適正なラボ環境でない場合、PCR産物は試薬、測定用薬品、およびゲノムDNA検体で汚染され、そのため結果が不正確で信頼できないものとなる可能性があります。また、PCR産物のコンタミネーションは、ラボでのプロセスを中断させ、通常の操作を大幅に遅らせることがあります。

PCR産物のコンタミネーションのリスクを減らすため、ラボ環境を適切にセットアップしてください。

- プレPCRエリアとポストPCRエリアを物理的に分離する**
  - プレPCRのプロセス (DNA抽出、定量化、およびノーマライズ) を行う専用の実験スペースと、ポストPCRのプロセス (PCR産物の作製および処理) を行う専用の実験スペースをそれぞれ設けて、物理的に分離してください。

- プレPCRの容器の洗浄とポストPCRの容器の洗浄には、同じ流し台を使用しないでください。
- プレPCRとポストPCRのプロセスで、同じ水精製システムを共有しないでください。
- プロトコールで使用する消耗品はすべてプレPCRエリアで保管し、必要に応じてポストPCRエリアに移動させてください。
- **専用の器具と消耗品を使用する**
  - プレPCRとポストPCRのラボプロセスではそれぞれ専用の器具と消耗品のセット（ピペット、遠心機、オープン、ヒートブロックなど）を用意し、これらの器具をプロセス間で共有しないようにしてください。
  - プレPCRとポストPCRの消耗品は、それぞれ異なる場所（冷凍庫および冷蔵庫）に保管してください。

プレPCRとポストPCRの試薬は同一の箱内で出荷されるため、プレPCRエリアで試薬を開梱することが重要です。開梱後、ポストPCRの試薬は適切なポストPCR保管エリアに移動してください。

## プレPCRおよびポストPCRのラボ手順

PCR産物のコンタミネーションを避けるためには、ラボ手順を確立してベストプラクティスに従うことが重要となります。イルミナでは、0.5%次亜塩素酸ナトリウム（10%漂白剤）を使用してラボエリアの毎日の清掃と毎週の清掃を行うことを推奨します。



### 警告

サンプルまたは試薬の劣化を防ぐため、プロセスを開始する前に、クリーニング溶液から出たすべての蒸気が完全に消散したことを確認してください。

## プレPCRエリアの毎日の清掃

0.5%次亜塩素酸ナトリウム（10%漂白剤）溶液を使用してプレPCRエリアを毎日清掃すると、このエリアに入ったPCR産物を除去するのに役立ちます。

プレPCRエリア内でコンタミネーションのリスクが最も高い場所を特定し、プレPCRのプロセスを開始する前に、0.5%次亜塩素酸ナトリウム（10%漂白剤）溶液を使用して該当場所を清掃してください。コンタミネーションのリスクが高い場所としては以下が含まれますが、これらに限定されません。

- ベンチトップ
- ドアのハンドル部分
- 冷蔵庫/冷凍庫のドアのハンドル部分
- コンピューターマウス
- コンピューターキーボード

## ポストPCRエリアの毎日の清掃

ポストPCRエリアにおいてPCR産物の量を少なくすると、プレPCRエリアでのコンタミネーションのリスクを削減できます。0.5%の次亜塩素酸ナトリウム（10%の漂白剤）溶液でポストPCRエリアを毎日清掃すると、コンタミネーションのリスクを抑えることができます。

ポストPCRエリア内でコンタミネーションのリスクが最も高い場所を特定し、0.5%次亜塩素酸ナトリウム（10%漂白剤）溶液を使用して該当場所を毎日清掃してください。コンタミネーションのリスクが高い場所としては以下が含まれますが、これらに限定されません。

- サーマルサイクラー
- 増幅済みDNAを処理するために使用するベンチスペース
- ドアのハンドル部分
- 冷蔵庫/冷凍庫のドアのハンドル部分

- コンピューターマウス
- コンピューターキーボード

## ラボエリア全体の毎週の清掃

0.5%の次亜塩素酸ナトリウム（10%の漂白剤）を使用して、プレPCRエリアとポストPCRエリアをそれぞれ週に1回しっかりと清掃してください。

- ベンチトップとラボの設備の表面をすべて清掃します。
- 毎日の清掃の対象ではないすべての装置を清掃します。
- ラボの床をしっかりとモップ掛けします。
- 毎週の清掃を行う担当者がPCR産物のコンタミネーションの防止に関して適切なトレーニングを受けていることを確認します。

## 床に落としたアイテム

床は、ポストPCRエリアから来た個人の靴により運ばれてきたPCR産物で汚染されています。そのため、床に落ちた物はすべて汚染されたものとして扱います。

- 使い捨てのアイテム（空のチューブ、ピペットチップ、グローブ、ラボのコートハンガーなど）を床に落とした場合は、廃棄してください。
- ピペットや重要なサンプル容器など使い捨てではない用具を床に落とした場合には、ただちに用具を十分に清掃する必要があります。0.5%の次亜塩素酸ナトリウム（10%の漂白剤）溶液を使用しPCR産物のコンタミネーションを拭き取ります。
- 汚染アイテムが接触した表面はすべて清掃してください。使い捨てのアイテムかどうかにかかわらず、床に落ちた物を拾ったら、装着していたグローブを捨て、新しいものに交換しなければなりません。

## ベストプラクティス

シーケンス決定のためにライブラリーを調製する際は、常に、正しい分子生物学手法に準じて作業を行う必要があります。また、作業を開始する前に、プロトコル全体の手順をよく読んで理解し、必要な材料をすべて揃え、器具をプログラミングして使用できる状態にしてください。

## 溶液の取り扱い

ライブラリーを定量化したり、クラスターを形成するために濃縮されたライブラリーを希釈したりする際には、正しい方法で溶液の取扱いを行うことが非常に重要です。

- 時として、量の違いがわずかでも（ $\pm 0.5 \mu\text{L}$ ）、クラスター数に大きな違い（およそ10万）が生じることがあります。
- 検量線を作成する必要があるプロトコル（qPCRなど）や、少量でも正確な量を必要とするプロトコル（アジレントバイオアナライザなど）では、少量のピペット操作でも、誤差の原因となるおそれがあります。
- 少量の取り扱いを行う必要がある場合は、ピペットが正しく校正されていることを十分に確認してください。
- ピペットは、性能仕様で定められている容量の極限值では使用しないようにしてください。
- 特に少量の酵素を追加する際は、ピペットの操作ミスを最小に抑えるため、複数のサンプル用の試薬を同時に調製してください。これによって、少量のピペット操作を何度も繰返すことなく、試薬チューブからまとまった量を1回の操作で扱うことができます。1回のピペット操作で個々のサンプルに分取すれば、複数のサンプル間で標準化が実現します。

## 磁気ビーズの取り扱い



### 注意

精製の手順は、「消耗品および機器」のリストで指定されている96ウェルプレートおよび磁気スタンドを使用した場合にのみ実証されています。遠心チューブやその他の形式、つまり他のマグネットを使用した場合、同じような性能は保証されません。

- ビーズは使用前に室温に戻してください。
- ビーズを再利用することは避けてください。これらの手順を実行するときには必ず新しいビーズを添加してください。
- ビーズは使用直前に十分に懸濁して色が均一になるまでボルテックスしてください。
- ビーズをピペティングする際は、溶液の粘度に応じて、ゆっくり吸引し、ゆっくり分注してください。
- 最終収量に影響を与える可能性があるため、ビーズの損失は最小限に抑えるよう気を付けてください。
- 別段の記載が無い限り、各サンプルを取り扱うたびにチップを交換してください。
- 回収量を最大にするため、ビーズと混合したサンプルを室温でプロトコールに記載の時間インキュベートしてください。
- ウェルから上清を取り除いて廃棄する際には、シングルチャンネルピペットまたはマルチチャンネルピペットを使用して、ビーズの塊を崩さないように注意してください。
- 透明な上清を反応プレートから取り除く作業や、洗浄手順では、磁気スタンド上にプレートを置いたままにし、凝集した磁気ビーズの塊を崩さないようにすることが重要です。凝集した磁気ビーズがウェルの壁面から滑り落ちないように、ピペットのチップでの吸引はゆっくりと行ってください。
- 溶出後にビーズのキャリーオーバーを防ぐため、溶出液をビーズペレットから取り除く際には、約2.5  $\mu$ Lの上清を残してください。
- 残留汚染要因となる可能性があるため、ウェルの底からエタノールを完全に取り除くようにしてください。
- 静電気の力によるビーズの損失を防ぐため、反応プレートは磁気スタンド上に置いたままにし、室温で風乾させてください。ビーズにエタノールが残留していると、後続の反応の効率に影響を与えるため、残留エタノールは完全に蒸発させてください。少なくとも数分間乾燥するよう推奨していますが、それ以上の乾燥時間が必要になることもあります。残っているエタノールは、10  $\mu$ Lのピペットで取り除くことができます。
- 最終収量に影響を与える可能性があるため、ビーズが乾燥しすぎないようにしてください。
- ピペットチップでビーズをウェルの端から剥がさないでください。
- 溶出中のサンプル回収率を最大にするため、サンプルをマグネットに置く前に、サンプルとビーズの混合物を室温で2分間インキュベートしてください。

## クロスコンタミネーションの防止

クロスコンタミネーションを避けるため、以下を実践してください。

- アダプターチューブは、一度に1つのみを開けるようにしてください。
- 別段の記載が無い限り、各サンプルを取り扱うたびにチップを交換してください。
- ピペット操作は慎重に行って、こぼれないようにしてください。
- 異なるアダプターストックを取り扱うたびに、ピペットの洗浄および手袋の交換を行ってください。
- 手順の前後に作業台をしっかりと清掃してください。

## 潜在的なDNAコンタミネーション要因

このプロトコールでサンプルを取り扱ったり処理したりする際は、PCRアンプリコンの調製時と同様に、ベストプラクティスに準じてPCRコンタミネーション要因を回避してください。

## 温度について

ライブラリー作成の際、温度は重要な注意事項です。

- 特に指定されていない限り、ライブラリーは37°C以下の温度で保持してください。
- 試薬は、室温で解凍した後、氷の上に置いてください。

## 機器

- ご使用のサーマルサイクラーのユーザーガイドで説明されているプログラミング方法の指示に従い、ヒートリッド機能を使用してサーマルサイクラーを適切にプログラミングしてください。
- サーマルサイクラーに搭載のヒートリッド機能を利用して差し支えありません。