

Illumina DNA Prep with Enrichment

Reference Guide



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づきいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

商標はすべて、Illumina, Inc. または各所有者の所有物です。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

改訂履歴

文書	日付	変更内容
文書 #1000000048041 v05	2020年6月	NextSeq 2000 Sequencing System の希釈に関する情報を追加。 IDT for Illumina Nextera Indexes に関する情報を追加。
文書 #1000000048041 v04	2020年4月	製品名を Nextera Flex for Enrichment から Illumina DNA Prep with Enrichment に変更。 インデックスキットおよび試薬キットの名称を変更。 UD Index キットセット C および D のカタログ番号を更新。 旧 UD Index キットセット A ~ D を選択肢から削除。
文書 #1000000048041 v03	2019年11月	TruSight Hereditary Cancer パネルにイルミナのカatalog番号 20029551 を追加。 略語リストに TruSight Hereditary Cancer (TSCH) を追加。 化学的な警告ならびにゲノム DNA タグメンテーションステップの製品安全データシート (SDS) へのリンクを追加。 試薬の Hyb Buffer + IDT NXT Blockers (NHB1) を Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2) に変更。Plex 濃縮を行ったときにマイナーアリル頻度の検出率が低くなるのは生殖細胞系列/体細胞バリエーションの場合であることを明記。 Nextera XT v2 インデックスおよび Nextera XT インデックスに関する誤記を削除。
文書 #1000000048041 v02	2019年5月	Illumina Nextera UD Indexes に関する情報を追加。 文言を更新し、Pool Pre-Enriched Libraries にあった情報をプロトコルの「はじめに」の新たなセクションに移動。 Nextera Flex for Enrichment のワークフローに関する情報をより簡潔にするため、文書の前書きを更新。 新たな文言を追加するため「追加リソース」セクションを更新し、無関係なリソースを削除。 構成の整合性を高めるため、「プーリングの準備」の文言を更新。
文書 #1000000048041 v01	2019年1月	推奨される FFPE 標準物質定量法を追加。 体細胞バリエーションのハイブリダイゼーション温度を追加。 包装および消耗品に関する記号の説明を追加。 推奨される gDNA インプット量定量法を更新し、「gDNA インプット量 50 ng 未満」のセクションに移動。 ゲノム DNA や抽出 FFPE のサンプルインプット量に関する推奨事項を更新。 MiSeq and NovaSeq の最終ローディング濃度に関する推奨事項を更新。
文書 #1000000048041 v00	2018年10月	初版

目次

第1章 概要	1
はじめに.....	1
DNA インプット量に関する推奨事項.....	1
FFPE 組織サンプルのインプット量に関する推奨事項.....	2
血液および唾液のインプット量に関する推奨事項.....	2
サンプルインプット量に関する推奨事項.....	3
追加リソース.....	3
第2章 プロトコール	5
はじめに.....	5
ヒントとテクニック.....	6
Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー.....	8
ゲノム DNA タグメンテーション.....	9
タグメンテーション後の精製.....	10
タグメンテーションした DNA の増幅.....	12
ライブラリーの精製.....	14
濃縮前ライブラリーの定性.....	16
濃縮前ライブラリーのプーリング.....	17
プローブのハイブリダイゼーション.....	19
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー.....	23
濃縮ライブラリーの増幅.....	26
増幅した濃縮ライブラリーの精製.....	27
濃縮ライブラリーのチェック.....	29
ライブラリーの開始濃度への希釈.....	30
付録 A 補足的な手順	31
はじめに.....	31
ライブラリープールの濃縮.....	31
血液の溶解.....	33
唾液の溶解.....	34
付録 B サポート情報	37
はじめに.....	37
Illumina DNA Prep with Enrichment アッセイの原理.....	37
キットの内容.....	39
記号の説明.....	43
消耗品および機器.....	44
略語.....	47
テクニカルサポート	49

第1章 概要

はじめに	1
DNA インプット量に関する推奨事項	1
FFPE 組織サンプルのインプット量に関する推奨事項	2
血液および唾液のインプット量に関する推奨事項	2
サンプルインプット量に関する推奨事項	3
追加リソース	3

はじめに

本プロトコールでは、Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローを用いて最大 384 の DNA 由来ユニークデュアルインデックス化ペアエンドライブラリーを調製する方法について解説します。

Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローでは、

- ▶ タグメンテーションという酵素反応により、わずか 15 分で DNA の断片化とアダプター配列の付加をします。
- ▶ 50 ng 以上のインプット量で革新的なサンプルノーマライゼーションを行います。
- ▶ 抽出プロトコールを用いれば、全血サンプルや唾液サンプルから直接ライブラリーを調製することができます。
- ▶ 抽出したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルに対応しています (最適なパフォーマンスを実現するには ΔCq が 5 以下であることが推奨されます)。

DNA インプット量に関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Enrichment のプロトコールは、インプット量 10 ~ 1000 ng の高品質な二本鎖ゲノム DNA (gDNA) に対応しています。ヒト gDNA サンプルやその他の大きく複雑なゲノムの場合には、50 ng 以上の gDNA インプット量が推奨されます。

gDNA の純度を測定し、初期 gDNA サンプルの EDTA 含有量が 1 mM を超えていないこと、またフェノールやエタノールなどの有機夾雑物が混じっていないことを確認してください。フェノールやエタノールなどの有機夾雑物は、タグメンテーション反応を妨げ、アッセイ失敗の原因となることがあります。

gDNA インプット量 50 ng 以上

gDNA インプット量が 50 ~ 1000 ng の場合には、初期 gDNA サンプルの定量およびノーマライゼーションは不要です。

gDNA インプットが 50 ng 未満の場合

本プロトコールでは、10 ~ 49 ng の gDNA に由来する最終的な濃縮前ライブラリー収量のノーマライゼーションは行わないため、濃縮前と濃縮後にライブラリーの定量およびノーマライゼーションを行う必要があります。

インプット量 10 ~ 49 ng の gDNA を用いる場合には、初期 gDNA サンプルの定量により、必要な PCR サイクル数を求めることが推奨されます。二本鎖 gDNA インプット量の定量は、蛍光定量を使用した手法で行ってください。全核酸を測定するための手法 (NanoDrop やその他の UV 吸光法など) は使用しないでください。詳細については、[3 ページのサンプルインプット量に関する推奨事項](#)を参照してください。

gDNA 純度の測定

gDNA サンプルの純度測定に多く用いられる手法は UV 吸光法です。260 nm 吸光度と 280 nm 吸光度の比がサンプル純度の指標となります。本プロトコールは、260/280 吸光度比 1.8 ~ 2.0 の gDNA に対して最適化されています。この 1.8 ~ 2.0 という値は、純粋な gDNA サンプルであることを示しています。

サンプル純度の副次的指標として、260 nm 吸光度と 230 nm 吸光度の比を使用します。260/230 比の目標値は 2.0 ~ 2.2 です。測定値がこの範囲から外れている場合は、夾雑物が混入しています。全夾雑物（各種の要因、回避すべきもの、ライブラリー調製に影響を及ぼす物質などを含む）の一覧は、**Nextera XT トラブルシューティングテクニカルノート**を参照してください。

スタートの核酸を、pH 7.5 ~ 8.5、10 mM の Tris-HCl で希釈します。夾雑物が原因でタグメンテーションが不完全となると、ライブラリー調製が上手くいかず、クラスター形成が不十分となったり、シーケンス結果の質が低下したりすることがあります。

FFPE 組織サンプルのインプット量に関する推奨事項

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）DNA サンプルから信頼性と再現性のある結果を得るには、DNA の質を正確に評価し、本プロトコールで必要となる PCR サイクル数を求めます。詳細については、**3 ページのサンプルインプット量に関する推奨事項**を参照してください。

以下の FFPE DNA の質に関する基準に従って、ライブラリー調製を成功させるのに必要なインプット量を求めます。

- ▶ Δ Cq 値 5 以下の FFPE サンプルの場合、推奨される DNA インプットは 50 ~ 1000 ng です。
- ▶ Δ Cq 値が 5 を超える低品質の FFPE サンプルの場合には、Illumina DNA Prep with Enrichment は推奨されません。Δ Cq 値が 5 を超えるサンプルを使用することも可能ではありますが、ライブラリー調製が失敗する確率が増したり、アッセイの性能が低下したりする可能性があります。

FFPE の抽出

回収率を上げ、サンプルの消費を最小限に抑え、かつサンプルの完全性を維持できる核酸分離法を使用します。QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit では、核酸の収率が、このアッセイについて検証したその他の抽出法に比べて高値となります。

FFPE DNA の定性

最適なパフォーマンスを得るために、Infinium FFPE QC Kit と、KAPA qPCR MasterMix (Universal) および Primer Premix 搭載 Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System またはこれに相当する機器で、DNA サンプルの質を評価します。FFPE DNA の定性に関する詳細については、**Infinium HD FFPE QC アッセイのプロトコール（パート番号：15020981）**を参照してください。

FFPE 対照試料（任意）

本プロトコールを実行する際に、Horizon HD799（DNA）など、特性が明らかにされている標準物質を陽性対照として使用します。細胞株由来異種移植片から採取した FFPE サンプルも、条件を満たしていれば、対照試料として使用することができます。使用前に、蛍光定量を使用した手法により標準物質の定量を行ってください。



注意

陽性対照リファレンスサンプルや、テンプレートなしのコントロールを用いると、試薬を消費し、処理できる未知サンプルの合計数が減少します。

血液および唾液のインプット量に関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Enrichment のプロトコールは、新鮮全血サンプル（Flex Lysis Reagent Kit が必要）および唾液サンプルに対応しています。血液および唾液を用いる場合のプロトコールについては、**33 ページの血液の溶解**または **34 ページの唾液の溶解**を参照してください。

EDTA 試験管中の液体全血 10 μ L または Oragene 管中の唾液 30 μ L をスタートの核酸とする場合、濃縮前ライブラリーのノーマライゼーションは gDNA インプット量 50 ~ 1000 ng の場合と同じとなります。血液と唾液は異種サンプルであるため、Illumina DNA Prep with Enrichment のノーマライズ化ライブラリー作製能力は、溶解サンプルから得られる DNA の合計量によって異なります。以下の要因は、キットの性能とは無関係に、ライブラリーのノーマライゼーションに悪影響を及ぼすことがあります。

- ▶ 唾液サンプルの粘度
- ▶ 血液サンプルの鮮度
- ▶ 保存条件
- ▶ 白血球数に影響を及ぼす疾患の存在

サンプルインプット量に関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローは、以下のプロトコールおよび試薬キットを使用する場合、血液サンプル、唾液サンプル、FFPE サンプルに対応しています。

- ▶ Illumina Blood Lysis Protocol (血液) と Flex Lysis Reagent Kit
- ▶ Illumina Saliva Lysis Protocol (唾液)
- ▶ FFPE サンプル抽出用 QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (FFPE)
- ▶ 定性用 Infinium FFPE QC Kit (FFPE)

eBLT PCR プログラムの推奨 PCR サイクル数は、サンプルの濃度および質に基づいて調整します。詳細については、[12 ページのタグメンテーションした DNA の増幅](#)を参照してください。

表 1 サンプルのインプット量に関する推奨事項

サンプルの種類とインプット量	DNA インプット量の定量	DNA の質の要件	ノーマライズされた濃縮前ライブラリーの回収
ゲノム DNA 10 ~ 49 ng	必要	260/280 比 1.8 ~ 2.0	なし
ゲノム DNA 50 ~ 1000 ng	不要	260/280 比 1.8 ~ 2.0	あり
抽出 FFPE 50 ~ 1000 ng	必要	Δ Cq 値 5 以下	なし
唾液	不要	—	あり
血液	不要	—	あり

追加リソース

以下のリソースには、Illumina DNA Prep with Enrichment キットを使用してライブラリーを調製するための手順とガイドラインが記載されています。詳細については、[Illumina DNA Prep with Enrichment のサポートページ](#)をご覧ください。

- ▶ サンプル情報の記録、ライブラリーのシーケンス、データの解析に対応している製品と要件
- ▶ 本キットの使用に関する Q&A
- ▶ 本キットに関するトレーニングビデオと、関連する製品およびトピックの各種コース
- ▶ 本キットの最新版マニュアル

リソース	説明
Custom Protocol Selector	ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、分析法に合った十分な手順の生成ツールおよび詳細レベルを調整するためのオプションについて説明しています。
Illumina DNA Prep with Enrichment Checklist (文書番号: 1000000048601)	経験豊富なユーザー向けの手順チェックリストが用意されています。
Illumina DNA Prep with Enrichment Consumables and Equipment List (文書番号: 1000000048602)	ユーザー側で用意する消耗品および機器についての対話型のチェックリストが用意されています。
Illumina DNA Prep with Enrichment with RNA Probes (文書番号: 1000000070581)	Illumina DNA Prep with Enrichment を他社製 RNA プローブと併用するためのプロトコールが用意されています。
『Index Adapters Pooling Guide』 (文書番号: 1000000041074)	Illumina DNA/RNA UD Indexes 用 10 塩基対 IDT または 8 塩基対の Nextera XT および Nextera XT v2 Indexes と Illumina DNA Prep with Enrichment キットを併用する際のプーリングに関するガイドラインとデュアルインデックス手順について説明しています。
『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号: 1000000002694)	イルミナ製シーケンス製品に用いられているイルミナ製オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が用意されています。
Infinium HD FFPE QC Assay Protocol (文書番号: 15020981)	FFPE サンプルの DNA の質を測定するためのプロトコールが用意されています。
Illumina Free Adapter Blocking Reagent (文書番号: 1000000047585)	過剰な遊離アダプターをブロックし、インデックスホッピングを最小限に抑え、データの質を高めるためのプロトコールが用意されています。
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes のサポートページ	IDT for Illumina DNA/RNA Unique Dual (UD) インデックスに関する情報を提供しています。

第2章 プロトコール

はじめに	5
ヒントとテクニック	6
Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー	8
ゲノム DNA タグメンテーション	9
タグメンテーション後の精製	10
タグメンテーションした DNA の増幅	12
ライブラリーの精製	14
濃縮前ライブラリーの定性	16
濃縮前ライブラリーのプーリング	17
プローブのハイブリダイゼーション	19
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー	23
濃縮ライブラリーの増幅	26
増幅した濃縮ライブラリーの精製	27
濃縮ライブラリーのチェック	29
ライブラリーの開始濃度への希釈	30

はじめに

本章では、Illumina DNA Prep with Enrichment のプロトコールについて解説します。

- ▶ サンプルから解析に至るまでの全体的なシーケンスワークフロープランを見直し、製品と実験パラメーターの互換性を確認してください。
- ▶ 先に進む前に、キットの中身を確認し、必要なアイテムが揃っていることを確認してください。本プロトコールでは、ライブラリー調製試薬、濃縮試薬、濃縮プローブパネル、インデックスアダプターが必要となります。濃縮プローブパネルおよびインデックスアダプターは別売です。37 ページのサポート情報を参照してください。
 - ▶ 他社製のビオチン化プローブは特定の要件を満たしていなければなりません。40 ページの他社製パネルの要件を参照し、お使いの他社製プローブがその要件を満たしていることを確認してください。
- ▶ 規定の分量およびインキュベーションパラメーターを用いて、記載順にプロトコールを実行してください。

プーリングの準備

ライブラリーをプールする場合は、ライブラリー調製を開始する前に、Illumina Experiment Manager (IEM)、Local Run Manager または BaseSpace Sequence Hub を用いて、サンプルの情報を記録してください。お使いのシーケンスシステムに対応しているツールの情報については、[Illumina DNA Prep with Enrichment Product Compatibility](#) のページをご覧ください。

- ▶ 少ないプレックス数でプールする方法 (2-plex ~ 9-plex) については、『[Index Adapters Pooling Guide](#)』 (文書番号: 1000000041074) を参照してください。
- ▶ インデックスアダプターの配列とその記録方法については、『[Illumina Adapter Sequences](#)』 (文書番号: 1000000041074) を参照してください。

対応濃縮プレキシティ

Illumina DNA Prep with Enrichment 試薬は、1-plex および 12-plex 濃縮プレキシティで構成されており、これらの濃縮プレキシティで使用します。その他の濃縮プレキシティも可能ではありますが、プレキシティによっては追加の濃縮前ライブラリー調製試薬および濃縮プローブパネル試薬が必要となります。

非標準的な濃縮プレキシティで適切な濃縮収率を得るには、追加的な最適化が必要となる場合があります。最適な結果が得られる保証はありません。これらの濃縮プレキシティに必要な試薬の情報については、40 ページの規格外濃縮プレキシティ試薬を参照してください。

- ▶ **濃縮プレキシティ**とは、濃縮プローブパネルを用いたハイブリダイゼーションにおいて 1 回の濃縮反応でプールする濃縮前ライブラリーの数 (1 ~ 12) です。例えば、12 の濃縮前ライブラリーを合わせると、12-plex 濃縮プールが作製されます。
- ▶ **濃縮反応**とは、1 回の反応でプールされた濃縮前ライブラリーの数にかかわらず、特定の濃縮反応の作製数です。例えば、1 回の濃縮反応で 1-plex または 12-plex 濃縮プールを作製することができます。

濃縮後ライブラリーの合計数を算出するには、反応当たりの濃縮プレキシティに濃縮反応数を乗じます。例えば、1 回の 12-plex 濃縮プールの濃縮反応で、12 の濃縮後ライブラリーから成るプールが作製されます。

濃縮前ライブラリーのプーリングに関しては、Illumina DNA Prep with Enrichment 試薬は、以下の表に示す濃縮反応および濃縮プレキシティに対応しています。

Illumina DNA Prep with Enrichment 試薬	濃縮反応	濃縮プレキシティ
16 サンプルキット	16 回	1-plex
96 サンプルキット	8 回	12-plex

ヒントとテクニック

プロトコールにセーフティストップポイントが指定されていない限り、直ちに次の手順に進んでください。

クロスコンタミネーションの防止

- ▶ サンプルや試薬マスターミックスを添加したり移したりする際は、**サンプルごと**にチップを交換してください。
- ▶ マルチチャンネルピペットを用いてインデックスアダプターを添加する場合は、**行ごと**あるいは**列ごと**にチップを交換してください。シングルチャンネルピペットを使用する場合は、**サンプルごと**にチップを交換してください。
- ▶ 使用しないインデックスアダプターチューブやプレートは作業台から取り除いてください。

プレートのシール

- ▶ 96 ウェルプレートは、本プロトコールの以下のステップに入る前に必ず、ゴム製ローラーを使用して粘着シールで密閉し、プレートを覆ってください。
 - ▶ 攪拌ステップ
 - ▶ サーマルサイクリングステップ
 - ▶ 遠心ステップ
- ▶ マイクロシール「B」粘着シールは、-40°C ~ 110°Cで効果を発揮し、スカート付きまたはセミスカート付き PCR プレートに適しています。サーマルサイクリングや短期保管にはマイクロシール「B」シールを使用してください。
- ▶ マイクロシール「F」ホイルシールは、-70°Cまでの温度で効果を発揮し、最終ライブラリーを長期間入れておく 96 ウェルプレートの保管に適しています。

Enrichment Bead-Linked Transposomes (Enrichment BLT [eBLT]) の取扱い

- ▶ eBLT ストックチューブは、ビーズが常にバッファーに浸かった状態にするため、真つすぐに立てて冷蔵庫で保管してください。
- ▶ eBLT ストックチューブは、ビーズが完全に懸濁されるまでボルテックスしてください。ビーズが再沈殿するのを防ぐため、ピペッティングの前に遠心することは推奨されません。
- ▶ ビーズが 96 ウェルプレートの側面や上部に付着した場合は、280 × g で 3 秒間遠心し、その後、分注して懸濁します。

- ▶ ビーズを洗浄する際は、
 - ▶ プレートに合った磁気スタンドを使用してください。
 - ▶ プレートは磁気スタンドから取り外すよう指示されるまで磁気スタンドに載せたままにしておいてください。
 - ▶ 磁気スタンドに載せている間はプレートを攪拌しないでください。
 - ▶ ビーズペレットを動かさないでください。
 - ▶ ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
 - ▶ タグメンテーション洗浄バッファー（TWB）をビーズに直接分注してください。
 - ▶ 液体がチューブやウェルの側面や上部に付着した場合は、280 × g で 3 秒間遠心し、分量を液体に入れてください。

タグメンテーション洗浄バッファー（TWB）の取扱い

- ▶ 気泡の形成を最小限に抑えるため、ゆっくりピペッティングしてください。

IDT for Illumina DNA/RNA Unique Dual (UD) Indexes プレートの作製

- ▶ Illumina DNA Prep with Enrichment は、IDT® for Illumina® DNA/RNA Unique Dual (UD) Indexes、IDT for Illumina Nextera DNA Unique Dual (UD) Indexes、Nextera DNA Combinatorial Dual (CD) Indexes に対応しています。
- ▶ インデックスプレートは使い捨てです。
- ▶ IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes には、その他のイルミナ製インデックスアダプター（8 塩基対インデックスコード使用）とは異なる 10 塩基対インデックスコードが使用されています。お使いのシーケンスシステムが 10 塩基対インデックスコード仕様となっていることを確認してください。

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes を次のとおり作製してください。

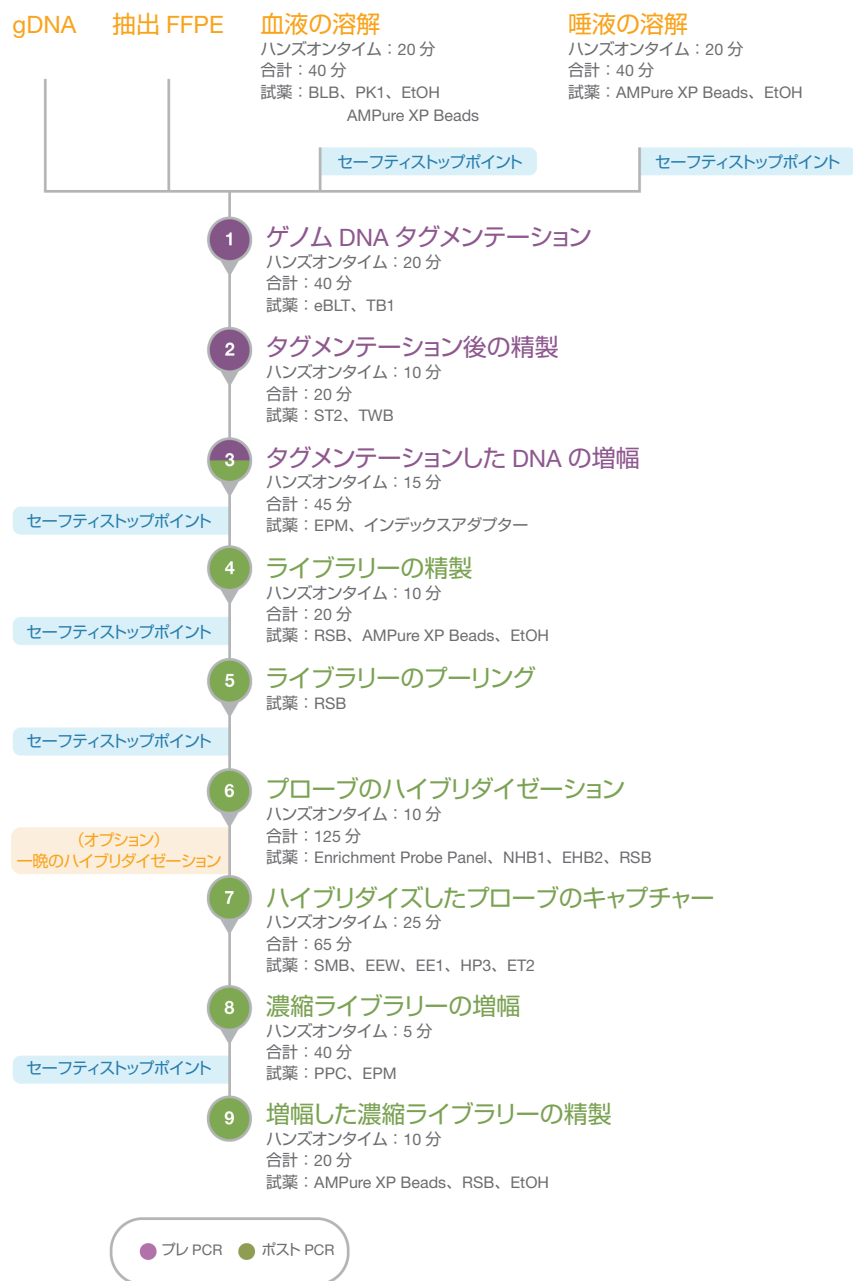
- ▶ 1000 x g で 1 分間遠心し、液体をシールから分離します。
- ▶ [サンプル数 96 未満] ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、インデックスアダプタープレートのホイルシールに、処理するサンプルの数だけ穴を開けます。
- ▶ [サンプル数 96] インデックスアダプタープレートの上部に新しい Eppendorf 96 ウェル PCR プレートを設置し、押し下げて、すべての 96 ウェルのホイルシールに穴を開けます。押し下げる際は、中身がひっくり返らないようゆっくり行ってください。
- ▶ ホイルシールに穴を開けるのに使用した空の Eppendorf プレートは廃棄してください。

Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー

下の図は、Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローです。ステップとステップの間にセーフティストップポイントがあります。

時間推定値は、12 個のサンプルを 12-plex 濃縮で処理したときのものです。

図 1 Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー



ゲノム DNA タグメンテーション

このステップでは、Enrichment Bead-Linked Transposomes (Enrichment BLT [eBLT]) を使用して DNA タグメンテーションを行います。DNA タグメンテーションとは、DNA を断片化してアダプター配列でタグ付けするプロセスです。

消耗品

- ▶ Enrichment Bead-Linked Transposomes (eBLT) (黄色キャップ)
- ▶ Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ▶ ヌクレアーゼフリー水
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ 8- チューブストリップ
- ▶ ピペットチップ
 - ▶ 200 μ L マルチチャンネルピペット



警告

この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については、support.illumina.com/sds.html に掲載の SDS を参照してください。

試薬について

eBLT は 2°C 以上で保管しなければなりません。2°C 未満で保管された eBLT は使用しないでください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
eBLT (黄色キャップ)	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。ピペティングの前に遠心しないでください。
TB1	-25°C ~ -15°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。

- 2 以下の TAG プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
 - ▶ 反応量を 50 μ L に設定します。
 - ▶ 55°C で 5 分間
 - ▶ 10°C で保持します。

手順

- 1 合計インプット量が 50 ~ 1000 ng となるよう、96 ウェル PCR プレートの各ウェルに DNA を 2 ~ 30 μL ずつ添加します。
- 2 DNA 量が 30 μL 未満である場合は、DNA サンプルにヌクレアーゼフリー水を添加して合計量を 30 μL にしてください。
- 3 eBLT (黄色キャップ) を 10 秒間しっかりボルテックスして懸濁します。必要に応じて繰り返します。
- 4 以下の分量を合わせてタグメンテーションマスターミックスを作製します。それぞれの分量に処理するサンプルの数を乗じてください。
 - ▶ eBLT (11.5 μL)
 - ▶ TB1 (11.5 μL)正確にピペティングできるよう、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 5 タグメンテーションマスターミックスをしっかりとボルテックスして懸濁させます。
- 6 上記の分量のタグメンテーションマスターミックスを 8- チューブストリップに均等に分割します。
- 7 200 μL マルチチャンネルピペットを用いて、サンプルが入っているプレートの各ウェルにタグメンテーションマスターミックスを 20 μL ずつ移します。サンプルの列ごとに新しいチップを使用してください。
- 8 タグメンテーションマスターミックスを分注した後の 8- チューブストリップは廃棄してください。
- 9 40 μL に設定した 200 μL マルチチャンネルピペットを用いて、サンプルを 10 回ずつピペティングします。サンプルの列ごとに新しいチップを使用してください。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
- 10 プレートをマイクロシール「B」で密閉し、事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、TAG プログラムを実行します。
- 11 TAG プログラムが 10°C に達するまで待ち、プレートを取り出して次に進むまで温度を維持します。

タグメンテーション後の精製

このステップでは、PCR 増幅の前に、eBLT 上でアダプターをタグ付けした DNA を洗浄します。

消耗品

- ▶ タグメンテーション停止バッファー 2 (ST2) (赤色キャップ)
- ▶ タグメンテーション洗浄バッファー (TWB)
- ▶ 96 ウェルプレートマグネット
- ▶ マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ 8- チューブストリップ
- ▶ ピペットチップ
 - ▶ 20 μL マルチチャンネルピペット
 - ▶ 200 μL マルチチャンネルピペット

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
ST2 (赤色キャップ)	15℃ ~ 30℃	沈殿物が認められた場合は、37℃で10分間温め、その後、沈殿物が溶解するまでボルテックスします。室温で使用してください。
TWB	15℃ ~ 30℃	室温で使用してください。

手順

- 1 96 ウェル PCR プレート を 2 分間室温に置いておきます。
- 2 タグメンテーション反応物に ST2 (赤色キャップ) 10 μ L を添加します。マルチチャンネルピペットを使用する場合は、ピペッティングで ST2 を 8- チューブストリップに添加し、その後、適切な分量を移します。
- 3 50 μ L に設定した 200 μ L ピペットを用いて、各ウェルを 10 回ずつゆっくりピペッティングし、ビーズを懸濁させます。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。必要に応じて繰り返します。
- 4 プレートを密閉し、室温で 5 分間インキュベートします。
- 5 プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 3 分間) 待ちます。
- 6 [サンプル数 48 以下] 以下の手順で洗浄します。
 - a 60 μ L に設定した 200 μ L マルチチャンネルピペットを用いて、上清を除去し、廃棄します。
 - b 磁気スタンドから外し、ゆっくりピペッティングしながら TWB 100 μ L をビーズに直接添加します。ゆっくりピペッティングすることで、TWB に気泡が生じるのを最小限に抑え、吸引量が不正確となって混合が不完全となるのを防ぐことができます。
 - c ビーズが完全に懸濁されるまでピペッティングします。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
 - d プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 3 分間) 待ちます。
 - e 100 μ L に設定した 200 μ L マルチチャンネルピペットを用いて、上清を除去し、廃棄します。
 - f 洗浄回数が計 2 回となるよう、上記 b ~ e のステップをもう 1 回繰り返します。
- 7 [サンプル数 48 超] 以下の手順で洗浄します。
 - a 60 μ L に設定した 200 μ L マルチチャンネルピペットを用いて、上清を除去し、廃棄します。
 - b すぐに、ゆっくりピペッティングしながら TWB 100 μ L をビーズに直接添加します。ゆっくりピペッティングすることで、TWB に気泡が生じるのを最小限に抑え、吸引量が不正確となって混合が不完全となるのを防ぐことができます。
 - c 上記 a および b のステップを、全列の処理が終わるまで、1 列または 2 列ずつ繰り返します。
 - d 磁気スタンドから外します。
 - e ビーズが完全に懸濁されるまでゆっくりピペッティングします。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
 - f プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 3 分間) 待ちます。
 - g 100 μ L に設定した 200 μ L マルチチャンネルピペットを用いて、上清を除去し、廃棄します。
 - h すぐに、TWB 100 μ L をビーズに直接添加します。
 - c 上記 g および h のステップを、全列の処理が終わるまで、1 列または 2 列ずつ繰り返します。
 - f 洗浄回数が計 2 回となるよう、上記 d ~ g のステップをもう 1 回繰り返します。

- 8 プレートをスタンドから外し、ゆっくりピペティングしながら TWB 100 μ L をビーズに直接添加します。ゆっくりピペティングすることで、TWB に気泡が生じるのを最小限に抑え、吸引量が不正確となって混合が不完全となるのを防ぐことができます。
- 9 各ウェルをゆっくりピペティングし、ビーズを懸濁させます。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
- 10 プレートを密閉し、磁気スタンドに載せて、液体が透明になるまで（約 3 分間）待ちます。**タグメンテーションした DNA の増幅**の項の**手順のステップ 4**に到達するまで、磁気スタンドに載せたままにしておきます。ビーズが乾燥しすぎないように、ウェル内の TWB はそのままにしておきます。

タグメンテーションした DNA の増幅

このステップでは、サイクルを制限した PCR プログラムを用いて、タグメンテーションした DNA を増幅します。PCR ステップにおいて、対になった 10 塩基対のインデックス 1 (i7) アダプター、インデックス 2 (i5) アダプター、そしてシーケンスクラスターの形成に必要な配列を付加します。濃縮用にプールするライブラリーインデックスのカラーバランスが適切であることを確認するには、『**Index Adapters Pooling Guide**』（文書番号：**1000000041074**）を参照してください。

インデックスアダプタープレートは、ライブラリー調製用品および濃縮用製品とは別売です。本プロトコルで使用できるインデックスアダプタープレートのリストについては、**39 ページのキットの内容**を参照してください。

消耗品

- ▶ Enhanced PCR Mix (EPM)
- ▶ インデックスアダプタープレート
- ▶ Eppendorf Lo Bind PCR Plate
- ▶ ヌクレアーゼフリー水
- ▶ マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ ピペットチップ
 - ▶ 20 μ L マルチチャンネルピペット
 - ▶ 200 μ L マルチチャンネルピペット

試薬について

- ▶ インデックスアダプタープレート
 - ▶ 1 個のウェルに 10 μ L 超のインデックスアダプターを入れることができます。
 - ▶ インデックスアダプタープレートにサンプルを添加しないでください。
 - ▶ インデックスプレートの各ウェルは使い捨てです。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
EPM	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。転倒混和し、その後、短時間遠心します。
インデックス アダプタープレート	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。

2 以下の表に記載されている適切な PCR サイクル数で、以下の eBLT PCR プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- ▶ 反応量を 50 μ L に設定します。
- ▶ 72°Cで 3 分間
- ▶ 98°Cで 3 分間
- ▶ サイクル数 X:
 - ▶ 98°Cで 20 秒間
 - ▶ 60°Cで 30 秒間
 - ▶ 72°Cで 1 分間
- ▶ 72°Cで 3 分間
- ▶ 10°Cで保持します。

プログラムの所要時間は、9 サイクルで計約 38 分程、12 サイクルで計約 46 分程です。

サンプルの種類とインプット量	PCR サイクル数 (X)
ゲノム DNA10 ~ 49 ng	12
ゲノム DNA50 ~ 1000 ng	9
抽出 FFPE 50 ~ 1000 ng	12
唾液	9
血液	9

手順

- 1 以下を合わせて PCR Master Mix を作製します。それぞれの分量に処理するサンプルの数を乗じてください。
 - ▶ EPM (23 μ L)
 - ▶ ヌクレアーゼフリー水 (23 μ L)
 正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 2 ボルテックスし、その後、PCR Master Mix を 280 \times g で 10 秒間遠心します。
- 3 プレートが磁気スタンドを載せた状態で、100 μ L に設定した 200 μ L マルチチャンネルピペットを用いて、上清を除去し、廃棄します。

ウェルの側面に残存する気泡がライブラリーに悪影響を及ぼすことはありません。
- 4 磁気スタンドから外します。
- 5 すぐに PCR Master Mix 40 μ L を各ウェルのビーズに直接添加します。
- 6 すぐに、ビーズが完全に懸濁されるまでピペティングして混合します。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
- 7 サンプルプレートを密閉し、280 \times g で 3 秒間遠心します。
- 8 インデックスアダプタープレートを 1000 \times g で 1 分間遠心します。
- 9 インデックスアダプタープレートを作製します。
 - ▶ [サンプル数 96 未満] ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、インデックスアダプタープレートのホイルシールに、処理するサンプルの数だけ穴を開けます。
 - ▶ [サンプル数 96] インデックスアダプタープレートの上部に新しい Eppendorf PCR プレートを配置し、押し下げて、ホイルシールに穴を開けます。ホイルシールに穴を開けるのに使用した Eppendorf PCR

プレートは廃棄してください。

- 10 新しいピペットチップを用いて、対になったインデックス 1 (i7) とインデックス 2 (i5) のインデックスアダプター 10 μ L を各ウェルに添加します。
- 11 40 μ L に設定したピペットを用いて、ピペッティングを 10 回行って混合します。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1600 rpm で 1 分間使用してください。
- 12 プレートをマイクロシール「B」で密閉し、280 \times g で 30 秒間遠心します。
- 13 サーマルサイクラーの上に置き、eBLT PCR プログラムを実行します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、 -25°C ~ -15°C で保存してください (最長 30 日間)。

ライブラリーの精製

このステップでは、両面ビーズ精製法を用いて、増幅したライブラリーを精製します。

消耗品

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ (AMPure XP Beads)、5 mL
- ▶ Resuspension Buffer (RSB)
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル 0.8 mL Polypropylene Deepwell Storage Plate (MIDI プレート) (2)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ マイクロシール「F」ホイルシール
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ ヌクレアーゼフリー水

試薬について

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ
 - ▶ 必ず室温で使用してください。
 - ▶ 使用前はその都度、ボルテックスしてください。
 - ▶ ビーズが均一になるよう、頻繁にボルテックスしてください。
 - ▶ 粘性の高い溶液ですので、吸引や分注はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
AMPure XP Beads	2°C ~ 8°C	30 分間室温に置いておきます。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	2°C ~ 8°C	融解して室温に戻します。ボルテックスして混合します。

- 2 無水エタノールから新鮮な 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 プレートシェーカーを用いて、96 ウェル PCR プレートを 1800 rpm で 1 分間攪拌します。

- 2 プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 1 分間）待ちます。
- 3 PCR プレートの各ウェルから、上清を 45 μ L ずつ、新しいの MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 4 AMPure XP Beads を複数回ボルテックスおよび転倒混和して懸濁させます。
- 5 gDNA、血液、唾液の場合は、以下のステップを行ってください。
 - a 上清を含有する各ウェルに、ヌクレアーゼフリー水を 77 μ L ずつ添加します。
 - b 上清を含有する各ウェルに、AMPure XP Beads を 88 μ L ずつ添加します。
 - c 各ウェルを 10 回ずつピペティングして混合します。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1800 rpm で 1 分間使用してください。
 - d プレートを密閉し、室温で 5 分間インキュベートします。
 - e 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 5 分間）待ちます。
 - f インキュベーションの際、AMPure XP ビーズをしっかりとボルテックスし、その後、**新しい**の MIDI プレートの各ウェルに 20 μ L ずつ添加します。
 - g 1 つ目のプレートの各ウェルから上清を 200 μ L ずつ、2 つ目のプレート (AMPure XP Beads 20 μ L 含有) の対応するウェルに移します。
 - h 2 つ目のプレートの各ウェルを 10 回ずつピペティングして混合します。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1800 rpm で 1 分間使用してください。
 - i 1 つ目のプレートは廃棄します。
- 6 抽出 FFPE の場合は、以下のステップを行ってください。
 - a 上清を含有するの MIDI プレートの各ウェルに、AMPure XP Beads を 81 μ L ずつ添加します。
 - b 各ウェルを 10 回ずつピペティングして混合します。あるいは、プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1800 rpm で 1 分間使用してください。
- 7 密閉したの MIDI プレートを室温で 5 分間インキュベートします。
- 8 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 5 分間）待ちます。
- 9 ビーズを動かさないようにして、上清を除去し、廃棄します。
- 10 以下の手順で 2 回洗浄します。
 - a プレートを磁気スタンドに載せた状態で、新鮮な 80% EtOH 200 μ L を添加します。混合はしないでください。
 - b 30 秒間インキュベートします。
 - c ビーズを動かさないようにして、上清を除去し、廃棄します。
- 11 20 μ L ピペットで、残存 EtOH を除去し、廃棄します。
- 12 磁気スタンド上で 5 分間風乾します。
- 13 磁気スタンドから外します。
- 14 ビーズに RSB 17 μ L を添加します。
- 15 プレートを密閉し、プレートシェーカーを 1800 rpm で 2 分間使用してください。
- 16 室温で 2 分間インキュベートします。
- 17 プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- 18 新しい 96 ウェル PCR プレートに上清 15 μ L を移します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、マイクロシール「B」粘着シールまたはマイクロシール「F」ホイルシールでプレートを密閉し、25°C ~ -15°C で保存してください（最長 30 日間）。

濃縮前ライブラリーの定性

ライブラリーの品質チェックを行っていない場合は、以下の手順に従い、トラブルシューティングが必要となった場合に備えてサンプルを取っておいてください。

- 1 それぞれの濃縮前ライブラリーを 1 μ L ずつ、新しい 96 ウェル PCR プレートに移します。
- 2 それぞれの濃縮前ライブラリーに RSB を 4 μ L ずつ添加します。
- 3 プレートマイクロシール「F」ホイルシールで密閉します。
- 4 25°C ~ -15°C で保存します（最長 30 日間）。

以下の手順に従って、濃縮前ライブラリーを定性します。

- 1 個々のライブラリーを 1 μ L ずつ、次のいずれの装置にかけます。
 - ▶ Advanced Analytical Fragment Analyzer + HS-NGS High Sensitivity 474 キット
 - ▶ ライブラリーに RSB 1 μ L を添加し、Fragment Analyzer に必要な分量である 2 μ L になるようにします。
 - ▶ Agilent Technology 2100 Bioanalyzer + DNA 1000 キット

図 2 および図 3 に示すように、150 ~ 1500 bp のサイズで解析した場合、平均断片サイズは 300 ~ 400 bp になると想定されます。

FFPE サンプルの場合、平均断片サイズは 250 bp と小さくなる可能性があります。

図 2 Fragment Analyzer によるトレースの見本

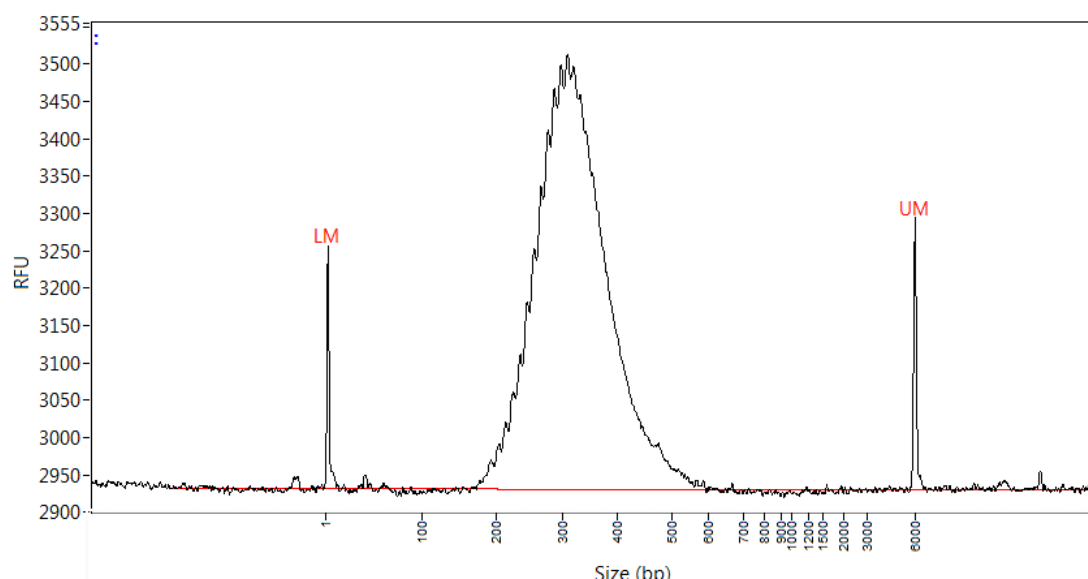
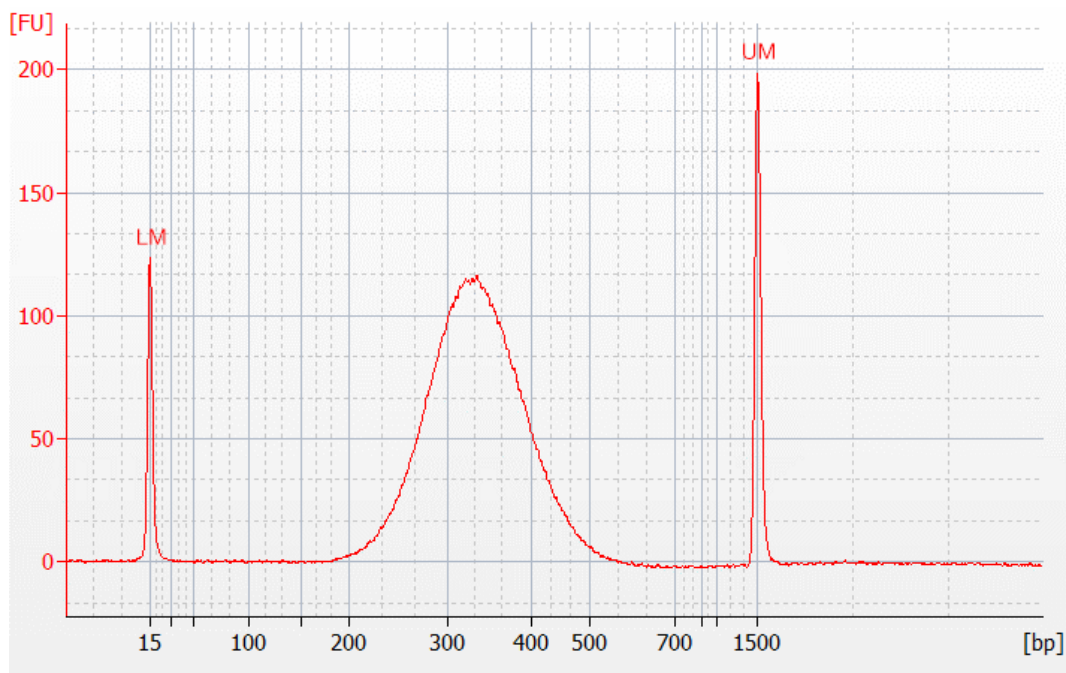


図 3 Bioanalyzer によるトレースの見本



濃縮前ライブラリーのプーリング

このステップでは、最大 12 個までのライブラリーのユニークなインデックスが付加された DNA ライブラリーを 1 個のプールにします。

プーリング法

体積比または質量比でプールすることができます。以下の表に従って、インプット量に見合った方法を選択してください。

表 2 推奨されるプーリング法

サンプルのインプット量	プーリング法
gDNA 10 ~ 49 ng	質量比または体積比 *
gDNA 50 ~ 1000 ng	体積比
抽出 FFPE 50 ~ 1000 ng	質量比または体積比 *
唾液	体積比
血液	体積比

* 体積比の場合は、1-plex 濃縮を用います。

- ▶ 1-plex 濃縮の場合には、濃縮前ライブラリーのプーリングは不要です。ただし、RSB の添加が必要となる場合があります。
- ▶ 濃縮前ライブラリーの定量後は、あらゆるインプット量および種類のサンプルを質量比でプールすることができます。最適なインデックスバランスを達成することができます。
- ▶ 別々の実験調製で作製した濃縮前ライブラリーは、最終収量が異なる場合があります。そのため、最適なインデックスバランスを達成するには、質量比でのプーリングが推奨されます。
- ▶ 次の場合には 1-plex 濃縮を用いてください。
 - ▶ gDNA 10 ~ 49 ng を体積比でプーリング
 - ▶ 抽出 FFPE 50 ~ 1000 ng を体積比でプーリング
 - ▶ 生殖細胞系列バリエントコールまたは体細胞バリエントコールのマイナーアリル頻度の検出率が低い

体積比でのプーリング

インプット量 50 ~ 1000 ng の gDNA の場合には、同一実験で作製された個々のライブラリーを定量してノーマライズする必要はありません。

最適なパフォーマンスを得るために、濃縮前ライブラリーサンプルは、作製者、試薬ロット、インデックスアダプタープレートが同一のもののみをプールしてください。

- 5 ページのプーリングの準備で選択したサンプル追跡法を用いて、このステップでプールするライブラリーのインデックスを記録します。
- 以下の表に記載されているサンプルの体積に基づいて、濃縮前ライブラリーをプールします。

ライブラリープールプレックス数	各濃縮前ライブラリーの体積 (μL)	総体積 (μL)
1-plex	14	30 (+ 16 RSB)
12-plex	2.5	30

質量比でのプーリング

インプット量 10 ~ 49 ng の gDNA または 50 ~ 1000 ng の抽出 FFPE サンプルをスタートの核酸として最適なサンプルバランスを達成するには、dsDNA 定量後と同じ濃度でライブラリーをプールしてください。

濃縮前ライブラリーの定量

- Qubit dsDNA BR Assay Kit で濃縮前ライブラリー 1 μL を解析し、ライブラリーの濃度 (ng/μL) を定量します。

ライブラリー収量は、サンプルの種類およびインプット量に基づき、次のとおり想定します。

表 3 想定される濃縮前ライブラリー収量

サンプルの種類とインプット量	濃縮前ライブラリー収量
gDNA 10 ~ 49 ng	100 ng 以上
血液/唾液の gDNA 50 ~ 1000 ng	250 ng 以上



注意

異なるバイアスが混入するその他の定量法については、本ワークフローで使用する場合の定性を行ってください。使用する定量法によって濃度の測定結果が異なる場合があります。

同一濃度での濃縮前ライブラリーのプーリング

以下のサンプルインプット量、種類、アプリケーションの場合には、1-plex 濃縮で濃縮前ライブラリー当たり 500 ng 以上を使用することが推奨されます。その他の濃縮プレキシティも可能な場合がありますが、最適な結果が得られる保証はありません。

- ▶ 分解したサンプル (FFPE など)
- ▶ 体細胞バリエーション
- ▶ マイナーアレル頻度の検出率が低い

高品質な DNA に由来するサンプルを質量比でプールする場合には、濃縮前ライブラリー当たり 100 ng という少ない量で濃縮に用いることができます。250 ng 未満の濃縮前ライブラリーをプールする場合には、適切な濃縮収率を得るために追加的な最適化が必要となる場合があります。最適な結果が得られる保証はありません。

濃縮前ライブラリー当たり 500 ng 未満で行う場合には、サンプルの定量結果に基づいて、各ライブラリーの質量を同一濃度まで減らしてください。トータル DNA ライブラリー量 (ng) が 500 ~ 6000 ng のままであることを確認してください。例えば、濃縮前ライブラリー当たり 250 ng である場合は、トータル DNA ライブラリー量 3000 ng で 12-plex 濃縮を行うことができますので、**同一濃度での濃縮前ライブラリーのプーリング**のステップ 2 ~ 4 を行ってください。

- 1 濃縮前ライブラリー当たり 500 ng になるよう調製します。必要に応じて RSB で希釈します。
- 2 **5 ページのプーリングの準備**で選択したサンプル追跡法を用いて、このステップでプールするライブラリーのインデックスを記録します。
- 3 各ライブラリー 500 ng を 1.5 mL マイクロチューブ内で合わせ、以下の表に示すプレキシティになるようにします。

ライブラリープール	各濃縮前ライブラリーサンプル (ng)	トータル DNA ライブラリー量 (ng)
1	500	500
12	500	6000

- 4 プールした濃縮前ライブラリーの合計体積に基づき、以下のいずれかを行ってください。
 - ▶ 濃縮前ライブラリーの体積が 30 μ L であれば、**19 ページのプローブのハイブリダイゼーション**に進みます。
 - ▶ 濃縮前ライブラリーの体積が 30 μ L 未満であれば、RSB を添加して、合計体積が 30 μ L になるようにします。
 - ▶ 濃縮前ライブラリーの体積が 30 μ L を超えていれば、次のいずれかの方法を用いて、プールしたサンプルを濃縮します。
 - ▶ **ビーズをベースとする方法**—**31 ページのライブラリープールの濃縮**の手順に従ってください。
 - ▶ **減圧濃縮器**—加熱なしで、乾燥速度を「中」に設定してください。

セーフティストップポイント

中断する場合は、1.5 mL マイクロチューブにキャップをして、 -25°C ~ -15°C で保存してください (最長 30 日間)。

プローブのハイブリダイゼーション

このステップでは、DNA の標的領域にキャプチャープローブを結合させます。

注意

本プロトコールでは、必要なプローブの量が、以前のイルミナ製濃縮プロトコールの半分となります。例えば、Illumina Exome Panel (CEX) は、以前のワークフローでは 48 個のサンプルに対応していましたが、本プロトコールを併用すれば、単一のハイブリダイゼーションワークフローであるため、96 個のサンプルに対応します。

Illumina DNA Prep with Enrichment 試薬は、イルミナ製と他社製の両方の濃縮 DNA オリゴヌクレオチドパネルに対応しています。他社製パネルに求められる仕様については、**40 ページの他社製パネルの要件**を参照してください。

消耗品

- ▶ Enrich Hyb Buffer 2 (EHB2)
- ▶ 濃縮プローブパネル
- ▶ Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2) (青色キャップ)
- ▶ Resuspension Buffer (RSB)

- ▶ 以下の容器のいずれか：
 - ▶ [プレート] 96 ウェル PCR プレート
 - ▶ [チューブ] 8- チューブストリップ
- ▶ 以下のシールのいずれか：
 - ▶ [プレート] マイクロシール「B」粘着シール
 - ▶ [チューブ] 8- チューブストリップキャップ

試薬について

- ▶ NHB2 は、保管中に沈殿し、分離します。
- ▶ 濃縮プローブパネルとは、本ワークフローで使用するイルミナ製または他社製の濃縮オリゴヌクレオチドパネルを指します。

事前準備

1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
EHB2	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。 結晶や混濁が認められた場合は、溶液が透明になるまで、再度ボルテックスするか、上下にピペティングしてしっかり混合します。
濃縮プローブパネル	-25°C ~ -15°C (イルミナ製) 他社製の場合はプローブによって異なります。	イルミナ製、他社製とも、パネルは室温に戻します。ボルテックスして混合します。 他社製パネルの場合は、以下の手順に従ってください。 他社製またはイルミナ製の濃縮アッセイで、メーカー推奨の反応当たりプローブ量を用いてください。 40 ページの他社製パネルの要件 に示す要件を満たすメーカー推奨のプローブ量を用いてください。 必要に応じて RSB を添加し、濃縮プレキシティにかかわらず濃縮反応当たりの合計量が 10 µL となるようにしてください。 例えば、他社製またはイルミナ製の濃縮アッセイでメーカーが 4 µL のプローブを使用することを推奨している場合は、RSB を 6 µL 添加して、本プロトコールで使用する濃縮反応当たりの合計プローブ量を 10 µL にします。
NHB2 (青色キャップ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。 室温になったら、マイクロヒーティングシステムで 5 分間予熱し、50°C にします。 最高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返し、懸濁させます。 短時間遠心します。 チューブの底から上下にピペティングします。 結晶や混濁が認められた場合は、溶液が透明になるまで、再度ボルテックスするか、上下にピペティングしてしっかり混合します。 再び沈殿物が生じないように、温かいうちに使用してください。
RSB	2°C ~ 8°C	他社製のプローブパネルを使用する場合は、室温に戻してください。ボルテックスして混合します。
SMB	2°C ~ 8°C	NF-HYB プログラムの 90 分間の待機時間の直後に次の手順に進む場合は、室温に戻してください。 保持時間を延長する場合は、NF-HYB プログラムが終了する 30 分以上前に室温に戻してください。
EEW (アンバーチューブ)	-25°C ~ -15°C	NF-HYB プログラムの 90 分間の保持時間の直後に次の手順に進む場合は、室温に戻してください。

2 表 4 に記載されている適切なサイクル数を用いて、以下の NF-HYB プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- ▶ 反応量を以下に設定します。
 - ▶ C1000 サーマルサイクラーの場合は 50 µL
 - ▶ Tetrad 2 サーマルサイクラーの場合は 100 µL
- ▶ 95°Cで 5 分間
- ▶ 1 分間を 1 サイクルとして X サイクル行います。第 1 サイクルは 94°Cで開始し、その後はサイクル当たり 2°Cずつ下げていきます。
- ▶ 該当する温度で 90 分間保持します。
 - ▶ [FFPE] 58°C
 - ▶ [CEX パネル] 58°C
 - ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
 - ▶ [その他] 62°C

他社製パネルの重複リードの割合を最適化する必要がある場合は、90 分間の保持時間を 2.5 ~ 16 時間に延長することで性能が向上することがあります。ハイブリダイゼーション時間を延長したときの BaseSpace Public Data のデータセット見本を参照してください。

- ▶ [オプション] 保持時間を最長 24 時間に延長します。

プログラムの所要時間は計 115 分間程です。

表 4 サンプルまたはパネル当たりのサイクル数

サンプルとパネルの種類	サイクル数 (X)
FFPE (パネルの種類を問わない)	18
CEX パネル (サンプルの種類を問わない)	18
体細胞バリエーション	18
その他のサンプルおよびパネル	16

手順

- 1 新しい PCR プレートまたは 8- チューブストリップの各ウェルに以下の試薬を添加します。試薬は記載順に各ウェルに添加しなければなりません。NHB2 および EHB2 のマスターミックスの作製は濃縮の性能に悪影響を及ぼします。
 - ▶ 濃縮前ライブラリーサンプルまたはプール (30 µL)
 - ▶ NHB2 (青色キャップ) (50 µL)
 - ▶ 濃縮プローブパネル (10 µL)
 - ▶ EHB2 (10 µL)
- 2 90 µL に設定したピペットを用いて、各ウェルを 10 回ずつピペッティングして混合します。
- 3 次のとおり遠心します。
 - ▶ [プレート] プレートをマイクロシール「B」で密閉し、280 × g で 30 秒間遠心します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、280 × g で 30 秒間遠心します。
- 4 サンプルプレートまたはサンプルチューブを、事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、NF-HYB プログラムを実行します。
- 5 NF-HYB プログラムの温度保持時間が終了したらすぐに次の手順に進みます。

**警告**

ハイブリダイゼーション反応の温度が室温未満まで下がると、沈殿が生じます。

ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー

このステップでは、SMB を用いて、対象となる標的領域にハイブリダイズしたプローブをキャプチャーします。

消耗品

- ▶ Streptavidin Magnetic Beads (SMB)
- ▶ Enhanced Enrichment Wash (EEW) (琥珀色キャップ)
- ▶ Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)
- ▶ 2N NaOH (HP3)
- ▶ Elute Target Buffer 2 (ET2)
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ 以下の容器のいずれか：
 - ▶ [プレート] 96 ウェルの MIDI プレートおよび 96 ウェル PCR プレート
 - ▶ [チューブ] 1.5 mL マイクロチューブおよび 8- チューブストリップ
- ▶ 以下のシールのいずれか：
 - ▶ [プレート] マイクロシール「B」粘着シール
 - ▶ [チューブ] 8- チューブストリップキャップ
- ▶ 以下の磁気製品のいずれか：
 - ▶ [プレート] Magnetic Stand-96
 - ▶ [チューブ] MagneSphere[®] Technology Magnetic Separation Stands (12 position、1.5 mL)

試薬について

- ▶ EEW
 - ▶ 室温に達すると混濁することがあります。
 - ▶ 外観が黄色になることがあります。
 - ▶ 使用前に加熱します。
- ▶ SMB
 - ▶ この手順には、Agencourt AMPure XP ビーズではなく、SMB を必ず使用してください。
 - ▶ SMB は必ず室温で使用してください。

事前準備

1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
SMB	2°C ~ 8°C	30 分間静置し、室温に戻します。使用前に転倒混和します。
EEW (アンバーチューブ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。30 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。 この手順の間に試薬を加熱します。
EE1	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。ピペティングして混合します。使用前に短時間遠心します。

項目	保管条件	説明
HP3	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合します。使用前に短時間遠心します。
ET2	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。使用前に短時間遠心します。

- 2 MIDI ヒートブロックを入れた 1 台以上のマイクロヒーティングシステムを予熱し、サンプルプレートインキュベーターに以下のいずれかの温度にします。任意で 2 台目のマイクロヒーティングシステムを使用して EEW を予熱することも可能です。

- ▶ [FFPE] 58°C
- ▶ [CEX パネル] 58°C
- ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
- ▶ [その他] 62°C

手順

キャプチャー

- 1 サンプルプレートまたはサンプルチューブを 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 2 100 µL に設定したピペットを用いて、96 ウェル PCR プレートまたは 8-ストリップチューブから各サンプルを、新しい MIDI プレートの対応するウェルまたは新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。
- 3 各ウェルまたはチューブに SMB を 250 µL ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1200 rpm で 4 分間攪拌します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
- 4 サンプルプレートまたはサンプルチューブをマイクロヒーティングシステムの MIDI ヒートブロックインサートの上に置き、蓋を閉めて、該当する温度で 15 分間インキュベートします。
 - ▶ [FFPE] 58°C
 - ▶ [CEX パネル] 58°C
 - ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
 - ▶ [その他] 62°C

サンプルをインキュベートしている間にステップ 5 に進みます。

- 5 2 台目のマイクロヒーティングシステムの MIDI ヒートブロックインサートの上に、チューブを横に倒して入れ、EEW (アンバーチューブ) を以下の温度まで予熱します。2 台目のマイクロヒーティングシステムがない場合は、ステップ 4 のインキュベーションの際に、MIDI ヒートブロックインサートの MIDI プレート上、または 1.5 mL マイクロチューブの横に EEW を置きます。25 ページの洗浄のステップ 2 に進むまで EEW を温めておきます。
 - ▶ [FFPE] 58°C
 - ▶ [CEX パネル] 58°C
 - ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
 - ▶ [その他] 62°C
- 6 すぐに、サンプルプレートまたはサンプルチューブを 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 7 すぐに磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 2 分間) 待ちます。
- 8 350 µL に設定したピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。

洗浄

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルまたはチューブに予熱した EEW（アンバーチューブ）を 200 μ L ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] 密閉し、1800 rpm で 4 分間攪拌します。液体がはねる場合は、速度を 1600 rpm まで下げてください。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。遠心はしないでください。
- 3 未使用の EEW をマイクロヒーティングシステムに戻し、保温します。
- 4 サンプルプレートまたはサンプルチューブをマイクロヒーティングシステムの MIDI ヒートブロックインサートの上に置き、蓋を閉めて、以下の温度で 5 分間インキュベートします。
 - ▶ [FFPE] 58°C
 - ▶ [CEX パネル] 58°C
 - ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
 - ▶ [その他] 62°C
- 5 [チューブ] 短時間遠心します。
- 6 すぐに磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- 7 200 μ L に設定したピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。
- 8 洗浄回数が計 3 回となるよう、1 ~ 7 のステップを 2 回繰り返します。

移動洗浄

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルまたはチューブに予熱した EEW（アンバーチューブ）を 200 μ L ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] 密閉し、1800 rpm で 4 分間攪拌します。液体がはねる場合は、速度を 1600 rpm まで下げてください。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。遠心はしないでください。
- 3 懸濁したビーズ溶液 200 μ L を、新しい MIDI プレートまたは新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。



警告

試薬を移すことで、試薬が残存して以降の PCR が妨げられるのを最小限に抑えることができます。

- 4 サンプルプレートまたはサンプルチューブをマイクロヒーティングシステムの MIDI ヒートブロックインサートの上に置き、蓋を閉めて、該当する温度で 5 分間インキュベートします。
 - ▶ [FFPE] 58°C
 - ▶ [CEX パネル] 58°C
 - ▶ [体細胞バリエーション] 58°C
 - ▶ [その他] 62°C
- 5 [チューブ] 短時間遠心します。
- 6 すぐに磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- 7 200 μ L に設定したピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。

- 8 プレートまたはチューブを 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 9 磁気スタンドに 10 秒間載せます。
- 10 20 μL ピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから残存する液体を除去し、廃棄します。
- 11 ビーズが乾燥し過ぎてライブラリー収量が減少するのを防ぐため、すぐに [26 ページの溶出](#)に進みます。

溶出

- 1 以下の分量を合わせて溶出ミックスを作製します。それぞれの分量に処理するサンプルの数を乗じてください。
 - ▶ EE1 (28.5 μL)
 - ▶ HP3 (1.5 μL)
 試薬に気泡が生じることがあるため、正確にピペティングできるよう、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 2 ボルテックスし、その後、溶出ミックスを 280 × g で 10 秒間遠心します。
- 3 磁気スタンドから外します。
- 4 各ウェルまたはチューブに溶出ミックスを 23 μL ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1800 rpm で 2 分間攪拌します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
- 5 プレートまたはチューブを室温で 2 分間インキュベートします。
- 6 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 7 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- 8 上清 21 μL を、の MIDI プレートまたは 1.5 mL マイクロチューブから、新しい 96 ウェル PCR プレートまたは新しい 8 チューブストリップの対応するウェルに移します。
- 9 上清 21 μL を含有する各ウェルまたはチューブに ET2 を 4 μL ずつ添加します。
- 10 ピペットを 20 μL に設定し、各ウェルまたはチューブをゆっくり 10 回ピペティングして混合します。
- 11 サンプルプレートまたはサンプルチューブを 280 × g で 30 秒間遠心します。

濃縮ライブラリーの増幅

このステップでは、濃縮ライブラリーを PCR で増幅します。

消耗品

- ▶ Enhanced PCR Mix (EPM)
- ▶ PCR Primer Cocktail (PPC)
- ▶ [プレート] マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ [チューブ] 8- チューブストリップキャップ

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
EPM	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心します。
PPC	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心します。

2 以下の表に記載されている適切な PCR サイクル数を用いて、以下の AMP プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- ▶ 反応量を 50 µL に設定します。
- ▶ 98°Cで 30 秒間
- ▶ サイクル数：
 - ▶ 98°Cで 10 秒間
 - ▶ 60°Cで 30 秒間
 - ▶ 72°Cで 30 秒間
- ▶ 72°Cで 5 分間
- ▶ 10°Cで保持します。

プログラムの所要時間は計 35 分間程です。

パネルの種類	サイクル数
Illumina Exome Panel (CEX)	10
その他のパネル	12 ¹²³

¹ 小型の他社製パネルの場合には、この後の最適化で、最大 15 サイクルに調節することができます。

² プローブ量が 500 しかない他社製パネルの場合には、最大 17 サイクルに調節することができます。

³ FFPE サンプルの場合には、PCR サイクル数を増やすと、重複リードの割合が高まり、断片サイズが小さくなる可能性があります。

手順

- 1 各ウェルまたはチューブに PPC を 5 µL ずつ添加します。
- 2 各ウェルまたはチューブに EPM を 20 µL ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - ▶ [チューブ] ピペッティングを 10 回行って混合し、8- チューブストリップのキャップをします。
- 3 プレートまたはチューブを 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 4 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、AMP プログラムを実行します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、2°C ~ 8°Cで保存してください（最長 2 日間）。または、サーマルサイクラーに載せたままにしておいてください（最長 24 時間）。

増幅した濃縮ライブラリーの精製

このステップでは、AMPure XP Beads を使用して、濃縮ライブラリーを精製し、不要なものを除去します。

消耗品

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ (AMPure XP Beads)、5 mL
- ▶ Resuspension Buffer (RSB)
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ [プレート] マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ 以下の容器のいずれか：
 - ▶ [プレート] 96 ウェルの MIDI プレートおよび 96 ウェル PCR プレート
 - ▶ [チューブ] 1.5 mL マイクロチューブ

- ▶ 以下の磁気製品のいずれか：
 - ▶ [プレート] Magnetic Stand-96
 - ▶ [チューブ] MagneSphere[®] Technology Magnetic Separation Stands (12 position、1.5 mL)

試薬について

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ
 - ▶ 必ず室温で使用してください。
 - ▶ 使用前はその都度、ボルテックスしてください。
 - ▶ ビーズが均一になるよう、頻繁にボルテックスしてください。
 - ▶ 粘性の溶液ですので、吸引や分注はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
AMPure XP Beads	2°C ~ 8°C	30 分間室温に置いておきます。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。

- 2 無水エタノールから新鮮な 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 PCR サンプルを 280 × g で 30 秒間遠心します。
- 2 上清 50 μL を、PCR プレートの各ウェルまたは 8- ストリップチューブから、新しい MIDI プレートの対応するウェルまたは新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。
- 3 AMPure XP Beads を複数回ボルテックスおよび転倒混和します。
- 4 各ウェルまたはチューブに AMPure XP Beads を 45 μL ずつ添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1800 rpm で 1 分間攪拌します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
- 5 サンプルプレートまたはサンプルチューブを室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 280 × g で 1 分間遠心します。
- 7 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 5 分間）待ちます。
- 8 95 μL に設定したピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 以下の手順で 2 回洗浄します。
 - a プレートを磁気スタンドに載せた状態で、新鮮な 80% EtOH 200 μL を添加します。混合はしないでください。
 - b 30 秒間インキュベートします。
 - c ビーズを動かさないようにして、上清を除去し、廃棄します。
- 10 20 μL ピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから残存 EtOH を除去し、廃棄します。
- 11 磁気スタンド上で 5 分間風乾します。
- 12 磁気スタンドから外し、各ウェルまたはチューブに RSB を 32 μL ずつ添加します。
- 13 次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1800 rpm で 1 分間攪拌します。

- ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。

14 プレートまたはチューブを室温で 5 分間インキュベートします。

15 280 × g で 30 秒間遠心します。

16 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。

17 上清 30 μL を、96 ウェル PCR プレートまたは 8- ストリップチューブから、新しい 96 ウェル PCR プレートの対応するウェルまたは新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、マイクロシール「B」粘着シールまたはマイクロシール「F」ホイルシールでプレートを密閉するか、チューブにキャップをして、-25°C ~ -15°C で保存してください（最長 7 日間）。

濃縮ライブラリーのチェック

以下の手順により、濃縮ライブラリーの濃度と質をチェックします。

- 1 Qubit dsDNA BR Assay Kit で濃縮ライブラリー 1 μL を解析し、ライブラリーの濃度を定量します。濃縮後ライブラリー収量は 3 ng/μL 以上と想定されます。小型の他社製パネルの場合には、ライブラリー収量がこれよりも少なくなることがあります。



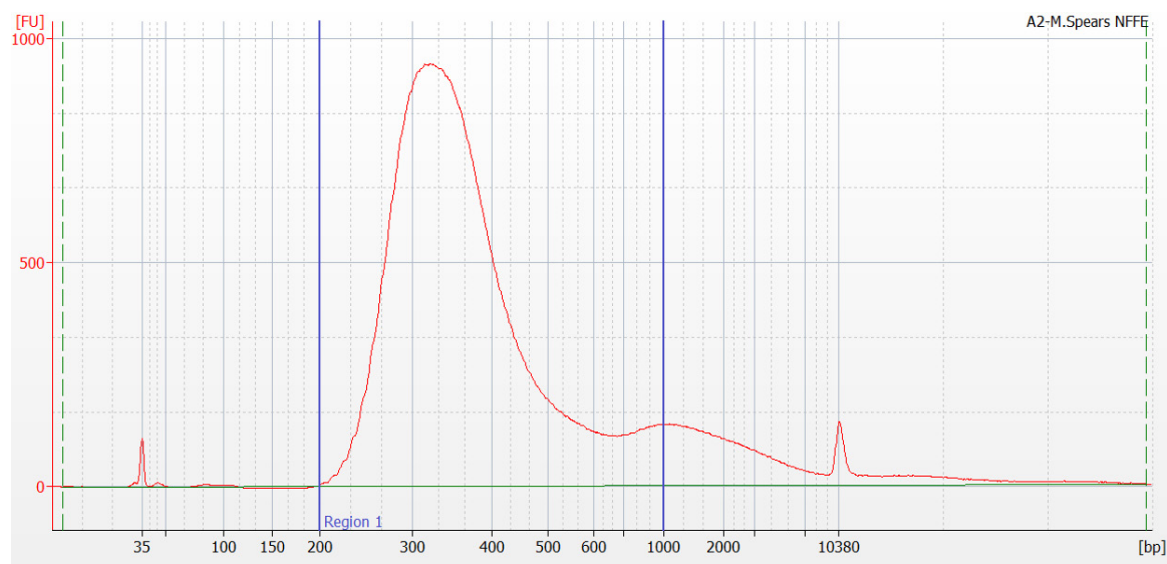
注意

プローブの総モル濃度は、比例的に濃縮後ライブラリー収量に影響を及ぼします。他社製プローブパネルでは、濃縮後ライブラリー収量が比例的に減少することがあります。その場合も、シーケンスマトリクスは仕様を満たしていると考えられます。

- 2 High Sensitivity DNA キットを用いて、Agilent Technology 2100 Bioanalyzer で、プールしたライブラリーまたは個々のライブラリー 1 μL を解析します。

DNA 断片の平均サイズは約 350 bp で、約 200 bp から約 1000 bp までの範囲内になると想定されます。

図 4 Bioanalyzer によるトレースの見本



ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップでは、ライブラリーをシーケンスシステムの開始濃度まで希釈します。これは段階希釈の最初のステップです。開始濃度への希釈後に、ライブラリーは、変性できる状態かつ最終ローディング濃度に希釈できる状態となります。

シーケンスには、使用する濃縮プローブパネルにかかわらず、リード当たり 101 サイクル (2 × 101)、インデックスリード当たり 10 サイクルのペアエンドランを設定することが推奨されます。オーバーラップさせたリードや生のカバレッジを追加したい場合は、最大 2 × 126 または 2 × 151 でシーケンスを行うことができますが、これは必須ではありません。

- 以下の式を用いて、ライブラリーまたはライブラリープールのモル濃度を求めます。
 - Bioanalyzer で定性したライブラリーの場合は、そのライブラリーの平均サイズを使用します。
 - その他の定性法の場合は、ライブラリーの平均サイズを 350 bp とします。
- モル濃度を用いて、ライブラリーをお使いのシステムの開始濃度に希釈するのに必要な RSB とライブラリーの量を算出します。

シーケンスシステム	開始濃度 (nM)	最終ローディング濃度 (pM)
HiSeq 2500 and HiSeq 2000 Systems (高アウトプットモード)	2	16 ~ 18
HiSeq 2500 System (高速ランモード)	2	7 ~ 8
HiSeq 4000 and HiSeq 3000 Systems	2 ~ 3	150 ~ 200
iSeq 100 System	2	100
MiniSeq System	2	1.7 ~ 1.8
MiSeq System (v3 試薬)	4	10 ~ 12
NextSeq 550 and NextSeq 500 Systems	2	1.4 ~ 1.5
NextSeq 2000 System	2	1000
NovaSeq 6000 System (標準ワークフロー)	2	175 ~ 185

- RSB を用いてライブラリーを希釈します。
 - マルチプレックスライブラリープールとして定量したライブラリー**—プールをお使いのシステムの開始濃度まで希釈します。
 - 個別に定量したライブラリー**—各ライブラリーをお使いのシステムの開始濃度まで希釈します。チューブに希釈後の各ライブラリーを 10 µL ずつ添加して、マルチプレックスライブラリープールを作製します。
- お使いのシステムの変性および希釈手順に従って、最終ローディング濃度に希釈します。
 - iSeq 100 System の場合は、同システムの取扱説明書の希釈手順を参照してください (ライブラリーは自動的に変性されます)。
 - NovaSeq 6000 System の場合は、同システムの取扱説明書のプーリングおよび変性手順を参照してください。
 - HiSeq 4000 System および HiSeq 3000 System の場合は、cBot 2 システムまたは cBot システムの取扱説明書の試薬調製手順を参照してください。
 - その他のシステムの場合は、それぞれのライブラリー変性および希釈手順を参照してください。

最終ローディング濃度が出発点であり、大まかな指標となります。その後のシーケンスランで、あるいはフローセル滴定により、使用するワークフローおよび定量法に合わせて濃度を最適化してください。

付録 A 補足的な手順

はじめに	31
ライブラリープールの濃縮	31
血液の溶解	33
唾液の溶解	34

はじめに

本章では、Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー内でオプションで行える手順について解説します。

ライブラリープールの濃縮

プールした濃縮前ライブラリーの合計量が 30 μ L を超える場合は、最終的な分量が 30 μ L となるようにサンプルを濃縮しなければなりません。このビーズをベースとする方法を用いて、最終的な分量を 30 μ L にします。詳細については、[18 ページの質量比でのプーリング](#)を参照してください。

消耗品

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ (AMPure XP Beads)、5 mL
- ▶ Resuspension Buffer (RSB)
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ [プレート] マイクロシール「B」粘着シール
- ▶ 以下の容器のいずれか：
 - ▶ [プレート] 96 ウェルの MIDI プレートおよび 96 ウェル PCR プレート
 - ▶ [チューブ] 1.5 mL マイクロチューブ
- ▶ 以下の磁気製品のいずれか：
 - ▶ [プレート] Magnetic Stand-96
 - ▶ [チューブ] MagneSphere Technology Magnetic Separation Stands (12 position、1.5 mL)

試薬について

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ
 - ▶ 必ず室温で使用してください。
 - ▶ 使用前はその都度、ボルテックスしてください。
 - ▶ ビーズが均一になるよう、頻繁にボルテックスしてください。
 - ▶ 粘性の溶液ですので、吸引や分注はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
AMPure XP Beads	2°C ~ 8°C	30 分間室温に置いておきます。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。

- 2 無水エタノールから新鮮な 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 サンプルチューブを 280 × g で 1 分間遠心します。
- 2 サンプルを、新しい MIDI プレートの対応するウェルまたは新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。



注意

プール量が 178 μ L 以上の場合は、1.5 mL マイクロチューブを用いて、の MIDI プレートウェルから液体があふれ出るのを防ぎます。

- 3 AMPure XP Beads を複数回ボルテックスおよび転倒混和して懸濁させます。
- 4 1.8 倍のプール量の AMPure XP Beads を各ウェルまたはチューブに添加し、次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1800 rpm で 1 分間撹拌します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
- 5 プレートまたはチューブを室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 280 × g で 1 分間遠心します。
- 7 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 5 分間) 待ちます。
- 8 各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 以下の手順で 2 回洗浄します。
 - a プレートを磁気スタンドに載せた状態で、各ウェルまたはチューブに、新たに調製した 80% EtOH を 200 μ L ずつ添加します。
 - b 30 秒間インキュベートします。
 - c 200 μ L に設定したピペットを用いて、各ウェルまたはチューブから上清をすべて除去し、廃棄します。
- 10 20 μ L ピペットで、残存 EtOH を除去し、廃棄します。
- 11 磁気スタンド上で 5 分間風乾します。
- 12 磁気スタンドから外し、各ウェルまたはチューブに RSB を 32 μ L ずつ添加します。
- 13 次のとおりしっかり混合します。
 - ▶ [プレート] プレートを密閉し、1800 rpm で 1 分間撹拌します。
 - ▶ [チューブ] チューブにキャップをして、高速で 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
- 14 サンプルプレートまたはサンプルチューブを室温で 5 分間インキュベートします。
- 15 280 × g で 1 分間遠心します。
- 16 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (約 5 分間) 待ちます。
- 17 上清 30 μ L を、新しい 96 ウェル PCR プレートの対応するウェルまたは新しい 8- チューブストリップに移します。
- 18 [19 ページのプロープのハイブリダイゼーション](#)でプロトコールを再開します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、マイクロシール「B」粘着シールまたはマイクロシール「F」ホイルシールでプレートを密閉するか、8- チューブストリップにキャップをして、 -25°C ~ -15°C で保存してください (最長 30 日間)。

血液の溶解

Flex Lysis Reagent Kit で溶解した血液サンプルを用いて Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローを実行する場合は、本プロトコールを使用してください。本プロトコールは、EDTA 採血管に採取した新鮮全血を用いて検証されています。血液は 4°C で保存し、3 日以内に処理してください。凍結血液の使用は、検証されていないため、推奨されません。

本プロトコールでは、血液溶解ステップ終了時の DNA アウトプットが 100 ng 超になると想定されます。

警告

血液は感染症の原因となる可能性があります。血液サンプルは、施設で定められた手順に従って、安全に取り扱ってください。溶解プロトコールでは、血液サンプル全体が完全に溶解している（加熱インキュベーションステップ後に茶色になっている）ことを確認してから、次のステップに進んでください。

消耗品

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ (AMPure XP Beads)、5 mL
- ▶ EDTA 採血管 (血液サンプル採取用)
- ▶ Blood Lysis Buffer (BLB)
- ▶ Proteinase K (PK1)
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ ヌクレアーゼフリー水
- ▶ 96 ウェル PCR プレート

試薬について

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ
 - ▶ 必ず室温で使用してください。
 - ▶ 使用前はその都度、ボルテックスしてください。
 - ▶ ビーズが均一になるよう、頻りにボルテックスしてください。
 - ▶ 粘性の溶液ですので、吸引や分注はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
AMPure XP Beads	2°C ~ 8°C	30 分間室温に置いておきます。ボルテックスおよび転倒混和します。
BLB	15°C ~ 30°C *	凍結させている場合は、室温で融解してください。沈殿物が認められた場合は、37°C で 10 分間温め、懸濁するまでボルテックスします。
PK1	-25°C ~ -15°C	必要時まで氷上に置いておきます。

*BLB は、-25°C ~ -15°C で出荷されますが、保存は 15°C ~ 30°C で行ってください。

- 2 無水エタノールから新鮮な 80% EtOH を調製します。
- 3 以下の BLP プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
 - ▶ 56°C で 10 分間

手順

- 1 以下の分量を合わせて溶解マスターミックスを作製します。それぞれの分量に処理するサンプルの数に乗じてください。
 - ▶ BLB (7 μ L)
 - ▶ PK1 (2 μ L)
 - ▶ ヌクレアーゼフリー水 (31 μ L)
 正確にピペティングできるよう、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 2 溶解マスターミックスをボルテックスして遠心します。
- 3 EDTA チューブを 10 回転倒混和します。
- 4 血液 10 μ L をチューブから 96 ウェル PCR プレート の 1 個のウェルに移します。
- 5 各サンプルに溶解マスターミックスを 40 μ L ずつ添加します。
- 6 AMPure XP Beads を複数回ボルテックスおよび転倒混和して懸濁させます。
- 7 ウェルに AMPure XP Beads 20 μ L を添加します。
- 8 50 μ L に設定したピペットを用いて、ピペティングをゆっくり 10 回行って混合します。
- 9 プレートを密閉し、事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、BLP プログラムを実行します。
- 10 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。溶解反応後の血液は暗褐色であるため、液体は透明にはなりません。ビーズは 5 分後に遊走します。
- 11 ビーズを動かさないようにして、上清を除去し、廃棄します。
- 12 ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで (約 2 分間) 待ちます。
- 13 ウェルに新鮮な 80% EtOH 150 μ L を添加します。
- 14 磁気スタンド上で 30 秒間インキュベートします。
- 15 ピペティングで EtOH を除去し、廃棄します。
- 16 20 μ L ピペットで、残存 EtOH をすべて除去し、廃棄します。
- 17 プレートを磁気スタンドから外します。
- 18 ヌクレアーゼフリー水 30 μ L を添加し、ピペティングで懸濁させます。
- 19 すぐに [9 ページのゲノム DNA タグメンテーションのステップ 3](#) に進むか、中断してサンプルとビーズの混合液を保存します。

セーフティストップポイント

[9 ページのゲノム DNA タグメンテーション](#)に進む前に中断する場合は、プレートをマイクロシール「B」粘着シールで密閉し、サンプルとビーズの混合液を 2°C ~ 8°C で保存してください (最長 3 日間)。

唾液の溶解

唾液サンプルを用いて Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローを実行する場合は、本プロトコールを使用してください。本プロトコールは、Oragene DNA Saliva 採取管で採取した唾液のみを用いて検証されています。唾液は、室温で安定するよう、コレクションチューブに含まれている Oragene DX Solution と混合します。本プロトコールでは、唾液溶解ステップ終了時の DNA アウトプットが 100 ng 超になると想定されます。

**警告**

唾液は感染症の原因となる可能性があります。唾液サンプルは、施設で定められた手順に従って、安全に取り扱ってください。

消耗品

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ (AMPure XP Beads)
- ▶ Oragene DNA 採取管 (唾液サンプル採取用)
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ ヌクレアーゼフリー水
- ▶ 96 ウェル PCR プレート

試薬について

- ▶ Agencourt AMPure XP ビーズ
 - ▶ 必ず室温で使用してください。
 - ▶ 使用前はその都度、ボルテックスしてください。
 - ▶ ビーズが均一になるよう、頻繁にボルテックスしてください。
 - ▶ 粘性の溶液ですので、吸引や分注はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

項目	保管条件	説明
Oragene DNA 採取管内の唾液サンプル	室温	サンプル採取後の任意の時点で、ウォーターバスまたはエアインキュベーター (DNA Genotek が推奨しているもの) で、50°C で 1 時間以上インキュベートし、細胞を溶解します。加熱処理後は室温で保存します。 Oragene/ 唾液サンプルの室温での長期保存および保証に関する情報は、DNA Genotek のウェブサイトを参照してください。
AMPure XP Beads	2°C ~ 8°C	30 分間室温に置いておきます。ボルテックスおよび転倒混和します。

- 2 無水エタノールから新鮮な 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 各サンプルとも、96 ウェル PCR プレートの 1 個のウェルにヌクレアーゼフリー水 20 μ L を添加します。
- 2 加熱処理済みの Oragene DNA コレクションチューブをボルテックスします。
- 3 チューブから水を含むウェルに唾液サンプル 30 μ L を移します。ゆっくりピペティングして混合します。サンプルが粘性の場合は、より正確にピペティングできるよう、ワイドボアピペットチップを使用してください。
- 4 AMPure XP Beads を複数回ボルテックスおよび転倒混和して懸濁させます。
- 5 ウェルに AMPure XP Beads 20 μ L を添加します。
- 6 50 μ L に設定したピペットを用いて、ピペティングをゆっくり 10 回行って混合します。
- 7 室温で 5 分間インキュベートします。

- 8 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
- 9 ビーズを動かさないようにして、上清を除去し、廃棄します。
- 10 ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- 11 ウェルに新鮮な 80% EtOH 150 μ L を添加します。
- 12 磁気スタンド上で 30 秒間インキュベートします。
- 13 ピペッティングで EtOH を除去し、廃棄します。
- 14 20 μ L ピペットで、残存 EtOH をすべて除去し、廃棄します。
- 15 プレートを磁気スタンドから外します。
- 16 ヌクレアーゼフリー水 30 μ L を添加し、ピペッティングで懸濁させます。
- 17 すぐに 9 ページのゲノム DNA タグメンテーションのステップ 3 に進むか、中断してサンプルとビーズの混合液を保存します。

セーフティストップポイント

9 ページのゲノム DNA タグメンテーションに進む前に中断する場合は、プレートをマイクロシール「B」粘着シールで密閉し、サンプルとビーズの混合液を 2°C ~ 8°C で保存してください（最長 3 日間）。

付録 B サポート情報

はじめに	37
Illumina DNA Prep with Enrichment アッセイの原理	37
キットの内容	39
記号の説明	43
消耗品および機器	44
略語	47

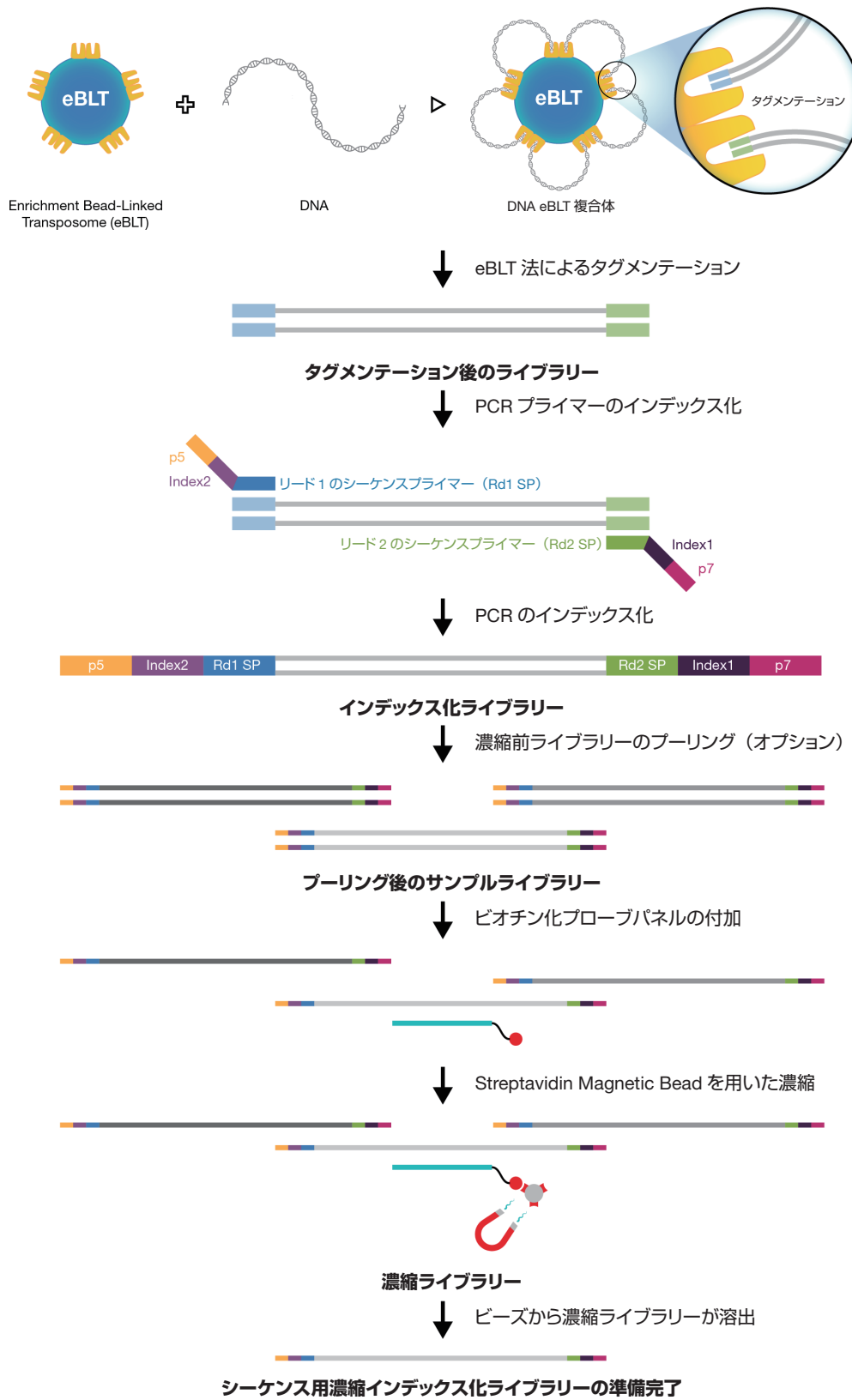
はじめに

本ガイドに記載されているプロトコールは、お客様が本章の内容に目を通し、ワークフローの内容を確認し、必要な消耗品および機器をすべて入手していることを前提としています。

Illumina DNA Prep with Enrichment アッセイの原理

Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフローでは、ビーズをベースとするトランスポソーム複合体を用いてゲノム DNA のタグメンテーションを行います。これは、1 つのステップで、DNA を断片化し、DNA にアダプター配列をタグ付けするというプロセスです。ビーズベースのトランスポソーム複合体は、インプットされた DNA で飽和状態になると、所定数の DNA 分子を断片化します。この断片化により、幅広いインプット量の DNA を用いて、断片サイズが一貫した厳密なノーマライズ化ライブラリーを作製することができます。タグメンテーション後は、限定サイクル PCR により、DNA 断片末端にアダプター配列を付加します。このステップは、イルミナの全シーケンスプラットフォームの土台となっています。この後は、標的濃縮ワークフローを実行します。濃縮は、個別に作製したライブラリー（1-plex）またはライブラリープール（最大 12-plex）のいずれでも行うことができます。プーリング後は、二本鎖 DNA ライブラリーを変性し、変性後のライブラリー断片にビオチン化オリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズします。ハイブリダイゼーション後、Streptavidin Magnetic Beads（SMB）が、対象領域内の標的ライブラリー断片をキャプチャーします。キャプチャーされてインデックス化されたライブラリーはビーズから溶出し、さらに増幅されたうえで、シーケンスに用いられます。

図 5 Illumina DNA Prep with Enrichment のワークフロー



キットの内容

Illumina DNA Prep with Enrichment のプロトコルを完了させるには、ライブラリー調製試薬、濃縮試薬、濃縮プローブパネル、インデックスアダプターが必要となります。必要なインデックスアダプター数は、インデックス化するサンプルの数によって異なります。サンプルのインプット量と種類ならびにシーケンス要件に応じて、追加で別売の消耗品が本プロトコルで必要となる場合があります。

項目	製品名	当社カタログ番号
ライブラリー調製濃縮試薬 ¹	Illumina DNA Prep with Enrichment - (S) Tagmentation, 16 Samples	20025523
	Illumina DNA Prep with Enrichment - (S) Tagmentation, 96 Samples	20025524
ライブラリー調製専用試薬 (濃縮プレキシティ 1-plex ~ 12-plex に対応) 40 ページの規格外濃縮プレキシティ試薬を参照してください。	Illumina DNA Prep - (S) Tagmentation, 16 Samples	20025519
	Illumina DNA Prep - (S) Tagmentation, 96 Samples	20025520
濃縮プローブパネル (あるいは、仕様を満たしている他社製プローブパネルをご使用ください) 40 ページの他社製パネルの要件を参照してください。	Illumina Exome Panel (8 Enrichment Reactions) (CEX)	20020183
	TruSight One (6 Enrichment Reactions) (TOO)	20029227
	TruSight One Expanded (6 Enrichment Reactions) (TOE)	20029226
	TruSight Cancer (8 Enrichment Reactions)	FC-121-0202
	TruSight Hereditary Cancer (8 Enrichment Reactions)	20029551
	TruSight Cardio (8 Enrichment Reactions)	20029229
	TruSeq Neurodegeneration (8 Enrichment Reactions)	20029550
	Illumina Custom Enrichment Panel via DesignStudio (8 Enrichment Reactions)	20025371
インデックスアダプター	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20027213
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20027214
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20042666
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20042667
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set C (96 Indexes, 96 Samples)	20027215
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set D (96 Indexes, 96 Samples)	20027216
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Sets A-D (384 Indexes, 384 Samples)	20027217
【オプション】 FFPE QC ²	Infinium FFPE QC Kit (384 reactions)	WG-321-1001
【オプション】 血液溶解 ³	Flex Lysis Reagent Kit (96 samples)	20018706
【オプション】 その他の試薬	Illumina Adapter Blocking Reagents (12 reactions)	20024144
	Illumina Adapter Blocking Reagents (48 reactions)	20024145

¹ Illumina DNA Prep with Enrichment 試薬は、必ず Illumina DNA Prep - (S) Tagmentation Library Prep Reagents と共に注文してください。

² 抽出 FFPE を用いて本プロトコルを開始するのに必要です。

³ 新鮮な全血サンプルを用いて本プロトコルを開始するのに必要です。

他社製パネルの要件

他社製ビオチン化 DNA プローブ（固定パネルまたはカスタムパネル）を使用する場合は、当該プローブが以下の仕様を満たしていることを確認してください。

- ▶ プローブ長 80 bp または 120 bp
- ▶ プローブ数 500 ~ 675,000
- ▶ 一本鎖または二本鎖
- ▶ プローブの合計インプット量 3 pmol 以上（プレキシティ 1-plex ~ 12-plex での濃縮の場合）

他社製 RNA ベースプローブを用いて Illumina DNA Prep with Enrichment のプロトコールを実行する場合には、『**Illumina DNA Prep with Enrichment with RNA Probes**』（文書番号：100000070581）を参照してください。

規格外濃縮プレキシティ試薬

濃縮プレキシティ 1-plex ~ 12-plex で実行するには、追加の濃縮前ライブラリー調製試薬が必要となります。濃縮反応数に応じて、追加の濃縮プローブパネル試薬が必要となる場合もあります。

以下の表に、16 サンプル設定を用いた場合の濃縮プレキシティ、サンプル数、必要反応数に基づく、規格外濃縮プレキシティに必要な追加のライブラリー調製試薬に関する情報を示します。

表 5 規格外プレキシティ対応試薬

濃縮プレキシティ	サンプル数	必要な濃縮反応数	数量	
			カタログ番号 20025523 (ライブラリーの 調製と濃縮)	カタログ番号 20025519 (ライブラリー調製のみ)
3	24	8	1	1
3	48	16	1	2
4	24	6	1	1
4	48	12	1	2
6	24	4	1	1
6	48	8	1	2
8	24	3	1	1
8	48	6	1	2

各濃縮プローブパネルの濃縮反応数は、使用する濃縮プレキシティおよびサンプル数に必要な濃縮反応数を満たしていなければなりません。

必要な濃縮プローブパネル試薬の数を求めるには、必要な濃縮反応数を、各濃縮プローブパネルの濃縮反応数で割り、小数第 1 位で四捨五入します。

Illumina DNA Prep - (S) Tagmentation の内容

Illumina DNA/RNA Prep - Tagmentation Buffers (15°C ~ 30°Cで保管)

以下のバッファーは 2°C ~ 8°C で出荷されます。正常に機能するよう、受領後は直ちに指定された温度で保管してください。

チューブの数量		略語	試薬名	チューブキャップの色
16 サンプル	96 サンプル			
1	4	ST2	Stop Tagment Buffer 2	赤色
1	1	TWB	Tagment Wash Buffer	透明

Illumina DNA Prep -Tagmentation (S) Beads (2°C ~ 8°Cで保管)

eBLT ストックチューブは、ビーズが常にバッファーに漬かった状態にするため、真っすぐに立てて保管してください。

チューブの数量		略語	試薬名	チューブキャップの色
16 サンプル	96 サンプル			
1	4	eBLT	Enrichment BLT	黄色
1	2	RSB	Resuspension Buffer	透明



注意

Agencourt AMPure XP ビーズは、本キットには含まれておりませんので、別途ご購入いただく必要があります。

Illumina DNA/RNA Prep - Tagmentation PCR Reagents (-25°C ~ -15°Cで保管)

以下の試薬は 2°C ~ 8°C で出荷されます。正常に機能するよう、受領後は直ちに指定された温度で保管してください。

チューブの数量		略語	試薬名	チューブキャップの色
16 サンプル	96 サンプル			
1	4	TB1	Tagmentation Buffer 1	透明
2	4	EPM	Enhanced PCR Mix	透明

Illumina DNA Prep with Enrichment - (S) Tagmentation の内容

Illumina DNA Fast Hyb - Enrichment Beads + Buffers (2°C ~ 8°Cで保管)

チューブの数量		略語	試薬名	チューブキャップの色
16 サンプル	96 サンプル			
4	2	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	透明
1	1	RSB	Resuspension Buffer	透明
1	1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明
1	1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明



注意

Agencourt AMPure XP ビーズは、本キットには含まれておりませんので、別途ご購入いただく必要があります。

Illumina DNA Fast Hyb - Enrichment PCR + Buffers (−25°C ~ −15°Cで保管)

以下の試薬は 2°C ~ 8°C で出荷されます。正常に機能するよう、受領後は直ちに指定された温度で保管してください。

チューブの数量		略語	試薬名	チューブキャップの色
16 サンプル	96 サンプル			
1	1	EE1	Enrichment Elution Buffer 1	透明
4	4	EEW	Enhanced Enrichment Wash	琥珀色
1	1	PPC	PCR Primer Cocktail	透明
1	1	HP3	2 N NaOH	透明
2	1	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers	青
2	1	EPM	Enhanced PCR Mix	透明

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes (−25°C ~ −15°Cで保管)

インデックスアダプターの配列については、『Illumina Adapter Sequences』(文書番号: 1000000002694)を参照してください。

製品名

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes (−25°C ~ −15°Cで保管)

インデックスアダプターの配列については、『Illumina Adapter Sequences』(文書番号: 1000000002694)を参照してください。

製品名

IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set C (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set D (96 Indexes, 96 Samples)

IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Sets A–D (384 Indexes, 384 Samples)

Infinium FFPE QC Kit (−25°C ~ −15°Cで保管) (オプション)

数量	略語	試薬名	チューブキャップの色
1	QCP	QC Primer Reagent	透明
1	QCT	QC Template Reagent	透明

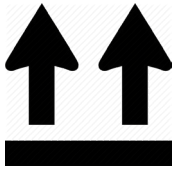






Flex Lysis Reagent Kit (オプション)




以下の試薬は −25°C ~ −15°C で出荷されます。正常に機能するよう、受領後は直ちに指定されたチューブ温度で保管してください。

数量	略語	試薬名	チューブキャップの色	保管温度
4	BLB	Blood Lysis Buffer	透明	15°C ~ 30°C
4	PK1	Proteinase K	透明	−25°C ~ −15°C

記号の説明

以下の表に、出荷時の包装、消耗品、消耗品の包装などに記載されている記号について説明します。

記号	説明
	どの方向が箱の上面であることを示しています。
	中身が壊れやすく、慎重に扱わなければならないことを示しています。
	保管温度がセ氏で記載されています。記載温度の範囲内で本消耗品を保管します ¹ 。
	本消耗品の使用期限です。最良の結果を得るために、この日まで使用してください。
	製造元（イルミナ）を示しています。
	用途は「研究用（RUO）」です。
	本消耗品を特定するための部品番号を示しています ² 。

記号	説明
	本消耗品の製造バッチまたは製造ロットを特定するためのバッチコードを示しています ¹ 。
	注意が必要であることを示しています。
	健康に害を及ぼすことを示しています。

¹ 保管温度が出荷時の温度とは異なる場合があります。

² REF は個々の構成部品を特定するものであり、LOT は当該構成部品が属するロットまたはバッチを特定するものです。

消耗品および機器

本プロトコルを開始する前に、ユーザー側で用意すべき必要な消耗品および機器がすべて揃っていることを確認してください。

特定のワークフローでのみ必要な消耗品および機器もあります。そのような消耗品および機器は別表に記載しています。

本プロトコルは、本ガイドに記載されている消耗品および機器を用いて最適化と検証がなされています。別の消耗品および機器を使用する場合、同等の性能は保証されません。

消耗品

消耗品	サプライヤー
1.7 mL マイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 μ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 μ 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 μ 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 μ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 μ 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 μ 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 μ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 μ 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 μ 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 μ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 μ 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-well 0.8 ml Polypropylene Deepwell Storage Plate (の MIDI プレート)	サーモフィッシャーサイエンティフィック、部品番号：AB-0859
コニカル遠心チューブ (15 mL または 50 mL)	一般的なラボ用品サプライヤー
蒸留水	一般的なラボ用品サプライヤー

消耗品	サプライヤー
Eppendorf™ twin.tec™ 96 Well LoBind PCR Plates, Skirted	エッペンドルフ、カタログ番号 0030129512
Hard-Shell 96-well PCR Plates	バイオ・ラッド、カタログ番号：HSP-9601
マイクロシール「B」粘着シール	バイオ・ラッド、カタログ番号：MSB-1001
マイクロシール「F」ホイルシール	バイオ・ラッド、カタログ番号：MSF-1001
RNase/DNase フリー 8- チューブストリップおよびキャップ	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	VWR、カタログ番号：89094-658
ディスプレイザブル	シグマ アルドリッチ、製品番号：E7023
分子生物学実験用エタノール 200 ブルー（無水）（500 mL）	一般的なラボ用品サプライヤー
ヌクレアーゼフリー水	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63880
Agencourt AMPure XP 精製ビーズ、5mL	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32850 または Q32853
Qubit dsDNA BR Assay Kit	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32856
Qubit Assay Tubes	以下のいずれか（機器によって異なります）
以下のいずれか（定量法によって異なります）	
<ul style="list-style-type: none"> • [Fragment Analyzer] High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit • [Bioanalyzer] Agilent DNA 1000 Kit (2) • [Bioanalyzer] Agilent High Sensitivity DNA Kit (2) 	<ul style="list-style-type: none"> • Advanced Analytical、カタログ番号：DNF-474 • アジレント、カタログ番号：5067-1504 • アジレント、カタログ番号：5067-4626
Tris-HCl 10 mM、pH 8.5	一般的なラボ用品サプライヤー

プレートワークフロー用消耗品

消耗品	サプライヤー
96-well 0.8 ml Polypropylene Deepwell Storage (の MIDI プレート)	サーモフィッシャーサイエンティフィック、部品番号：AB-0859
粘着シールローラー	一般的なラボ用品サプライヤー
Hard-Shell 96-well PCR Plates	バイオラッド、部品番号：HSP-9601
マイクロシール「B」粘着シール	バイオラッド、部品番号：MSB-1001
マイクロシール「F」ホイルシール	バイオラッド、部品番号：MSF-1001

チューブワークフロー用消耗品

消耗品	サプライヤー
RNase/DNase フリー 8- チューブストリップおよびキャップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1.5 mL マイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー

血液および唾液サンプル用消耗品

消耗品	サプライヤー
Agencourt AMPure XP ビーズ、5 mL	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63880
【血液】 Flex Lysis Reagent Kit	イルミナ、カタログ番号：20015884
【血液】 EDTA 採血管	ベクトン・ディッキンソン
【唾液】 Oragene DNA Collection Kit for Saliva	Genotek、カタログ番号：OGR-500 または OGD-510

FFPE サンプル用消耗品

消耗品	サプライヤー
KAPA qPCR Master Mix (Universal) and Primer Premix	KAPA Biosystems、カタログ番号：KK4923- 07960441001
Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	キアゲン、カタログ番号 80234
Infinium FFPE QC Kit	イルミナ、カタログ番号：WG-321-1001
お客様の機器に対応する qPCR プレート	一般的なラボ用品サプライヤー

機器

機器	サプライヤー
以下のサーマルサイクラーのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> • Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module • Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2 	バイオラッド、部品番号： <ul style="list-style-type: none"> • 1851197 • PTC-0240G* *現在は販売されていません。
Magnetic Stand-96	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：AM10027
微量遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー
Microheating System-Hybex System for Illumina	SciGene、カタログ番号： <ul style="list-style-type: none"> • 1057-30-0 (115 V) または • 1057-30-2 (230 V)
MIDI Heat Block Insert for SciGene Hybex System	イルミナ、カタログ番号：BD-60-601
Qubit Fluorometer 3.0	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q33216 または Q33217
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
以下のアナライザーのいずれか： Advanced Analytical： <ul style="list-style-type: none"> • Fragment Analyzer™ アジレントテクノロジー： <ul style="list-style-type: none"> • 2100 Bioanalyzer Desktop System 	Advanced Analytical (カタログ番号については製品のウェブサイトをご覧ください) アジレントテクノロジー： <ul style="list-style-type: none"> • 部品番号：G2940CA
【唾液】 到達温度 50°C のウォーターインキュベーターまたはエアインキュベーター	DNA Genotek の製品ページをご覧ください
【FFPE】 Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System または類似の FFPE 定性用 qPCR システム	バイオラッド、部品番号：1855196
【オプション】 減圧濃縮器 注意：ライブラリープールを濃縮する際に使用してください。	一般的なラボ用品サプライヤー

チューブワークフロー用機器

機器	サプライヤー
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands (12 position, 1.5 mL)	プロメガ、カタログ番号: Z5342

プレートワークフロー用備品

機器	サプライヤー
Magnetic Stand-96	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号: AM10027
High-Speed Microplate Shaker	BioShake iQ High-Speed Thermal Mixer <ul style="list-style-type: none"> キューインスツルメンツ、モデル番号: 1808-0506 BioShake XP High-Speed Thermal Mixer <ul style="list-style-type: none"> キューインスツルメンツ、モデル番号: 1808-0505
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー

サーマルサイクラー

以下の表に、推奨されるサーマルサイクラーの設定を示します。この表に記載されていないサーマルサイクラーをご使用の場合は、本プロトコルを実行する前にサーマルサイクラーの検証を行ってください。

サーマルサイクラー	温度モード	蓋の温度	容器の種類
Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module (部品番号: 1851197)	算出値	加熱	プレート
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2 (部品番号: PTC-0240G)	算出値	加熱、常に 100°C	ポリプロピレンのプレートおよびチューブ

略語

略語	定義
BLB	Blood Lysis Buffer
BLT	Bead-Linked Transposome
eBLT	Enrichment BLT
CEX	Coding Exome Oligos
EE1	Enrichment Elution Buffer 1
EEW	Enhanced Enrichment Wash
EHB2	Enrich Hyb Buffer 2
EPM	Enhanced PCR Mix
ET2	Elute Target Buffer 2
EtOH	エタノール
HP3	2 N NaOH
IEM	Illumina Experiment Manager
NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
NXT	Nextera
PK1	Proteinase K
PPC	PCR Primer Cocktail
QCP	QC Primer Reagent

略語	定義
QCT	QC Template Reagent
RSB	Resuspension Buffer
SMB	Streptavidin Magnetic Beads
ST2	Stop Tagment Buffer 2
TB1	Tagmentation Buffer 1
TOO	TruSight One Oligos
TOE	TruSight One Expanded
TSHC	TruSight Hereditary Cancer
TWB	Tagment Wash Buffer
UD	Unique Dual

テクニカルサポート

技術的な支援については、イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。

ウェブサイト: www.illumina.com
 メールアドレス: techsupport@illumina.com

イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	リージョナル
北米	+1.800.809.4566	
オーストラリア	+1.800.775.688	
オーストリア	+43 800006249	+43 19286540
ベルギー	+32 80077160	+32 34002973
中国	400.066.5835	
デンマーク	+45 80820183	+45 89871156
フィンランド	+358 800918363	+358 974790110
フランス	+33 805102193	+33 170770446
ドイツ	+49 8001014940	+49 8938035677
香港	800960230	
アイルランド	+353 1800936608	+353 016950506
イタリア	+39 800985513	+39 236003759
日本	0800.111.5011	
オランダ	+31 8000222493	+31 207132960
ニュージーランド	0800.451.650	
ノルウェー	+47 800 16836	+47 21939693
シンガポール	+1.800.579.2745	
韓国	+82 80 234 5300	
スペイン	+34 911899417	+34 800300143
スウェーデン	+46 850619671	+46 200883979
スイス	+41 565800000	+41 800200442
台湾	806651752	
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
その他の国	+44.1799.534000	

製品安全データシート (SDS) — 当社のウェブサイト (support.illumina.com/sds.html) から入手できます。

製品マニュアル— support.illumina.com よりダウンロード可能です。



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]