

illumina®

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment

Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000157112 v02 JPN

2022年8月

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

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。

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。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

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 10000000157112 v02	2022 年 8 月	<p>削除</p> <ul style="list-style-type: none"> 追加リソースのインデックスアダプタープーリングの参照にある Nextera XT の参照。 1-plex のプールプレックス数。 <p>更新</p> <ul style="list-style-type: none"> 追加リソースの『DNA Prep Checklist』へのリンク番号。 インデックスアダプターの配列の参照リンク。 NextSeq 1000/2000 の参照。 プローブのハイブリダイゼーションの所要時間を最小 2 時間に変更。 10～49 ng の推奨インプット量を 250～500 に変更。 SMB3、EE1、および EEW について試薬の転倒混和をボルテックスに変更し、融解時間を 2 時間に変更。 Twist Exome キットおよび Fast Hyb キットの配送温度。
文書番号： 10000000157112 v01	2022 年 6 月	<p>文書タイトルを更新。</p> <p>Exome 2.0 plus キットの情報の概要とパネルカバレッジの詳細な表を追加。</p> <p>サンプルのインプットに関する推奨事項の表で、必要な DNA インプット品質を更新。</p> <p>gDNA インプット量が 50 ng 以上の場合、ライブラリー調製中に自動的にノーマライズされることについて更新。</p> <p>gDNA の純度を評価するためのコンタミネーションリストを追加。リソースリストから Custom Protocol Selector を削除。エクソームパネルの使用を反映させるために、ガイドワークフローの画像を更新。</p> <p>プロトコールの概要に関するセクションを削除。</p>

文書番号	日付	変更内容
		<p>サンプルのインプットに関する推奨事項にプロトコールと試薬キットリストを追加。</p> <p>gDNA サンプルの二次評価の手順を更新。</p> <p>NextSeq 500 システムを使用したユニークデュアルインデックスプレートの IDT を準備する手順を追加。UD インデックスを準備する手順を更新し、96 未満のサンプルの準備についての詳細な説明を追加。</p> <p>eBLT の保管方法を更新して、インキュベーションを追加し、垂直に立てて保管することを記載。</p> <p>「ゲノム DNA のタグメンテーション」のより詳細なステップを追加。「タグメンテーション後の精製」の準備手順を更新し、マルチチャンネルピペットと、多数のサンプルの処理を追加。</p> <p>プーリングの準備の手順を更新し、ライブラリー調製を開始する前にインデックスを記録することを記載。</p> <p>単一 IPB の手法を更新。</p> <p>生産が終了したため、Free Adapter Blocking Reagent の参照を削除。</p> <p>Nextera XT のトラブルシューティングに関するテクニカルノートの参照を削除。</p> <p>付録のラベルを削除。</p>
文書番号： 10000000157112 v00	2021 年 4 月	初版リリース。

目次

概要	1
DNA インプットに関する推奨事項	2
血液および唾液のインプットに関する推奨事項	3
サンプルのインプットに関する推奨事項	3
追加リソース	4
プロトコール	5
プーリングの準備	5
ヒントおよびテクニック	6
Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフロー	8
ゲノム DNA のタグメンテーション	10
タグメンテーション後の精製	11
タグメンテーションした DNA の増幅	13
ライブラリーの精製	16
濃縮前のライブラリーの定性	18
濃縮前のライブラリーのプーリング	19
プローブのハイブリダイゼーション	24
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー	27
エクソーム濃縮ライブラリープールの増幅	30
増幅したエクソーム濃縮ライブラリープールの精製	31
エクソーム濃縮ライブラリープールのチェック	33
ライブラリーの開始濃度への希釈	35
追加の手順	37
[オプション] 血液の溶解	37
[オプション] 唾液の溶解	39
サポート情報	42
キットの内容	42
記号説明	45
消耗品および機器	47
Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment アッセイの仕組み	51
単一 IPB の手法	53
略語	55
テクニカルサポート	56

概要

Illumina® DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichmentキットには、高品質のヒト全ゲノムライブラリーから、ハイブリダイゼーションに基づいてエクソームを濃縮するために必要なライブラリー調製試薬や濃縮試薬などの試薬類、精製ビーズおよびサイズ選択ビーズ、ヒトエクソームパネル、インデックスなどが含まれています。

本キットには次のような特徴があります。

- 96 個のライブラリーを構築した後、8 つのハイブリダイゼーション反応により、これらのライブラリーを濃縮し 12 個のライブラリー（12-plex 濃縮）からなる、合計 96 個のヒトエクソーム濃縮ライブラリーを構築できます。
- 各濃縮反応においてライブラリー数が減少することがあるので、最適化を必要とし、各キットで濃縮される合計サンプル数を減らす必要がある可能性があります。

表 1 Twist Bioscience® for Illumina Exome 2.0 Plus Panelの詳細

ターゲット	カバレッジ
全体の合計ターゲット領域数	287,879
ACMG73_RefSeqCuratedCDS_hg38	99.91%
ACMG73_RefSeqCuratedCDS_PathVar_hg38	99.90%
CCDS_01212021_cds_hg38	99.91%
ClinVar_03212022_SNV-PathLikelyPath_CDS	98.55%
Cosmic_CGC_11142021_RefSeqCuratedCDS_hg38	99.91%
CosmicMutCensus_11142021_PathSomatic_hg38	88.69%
Gencode_v39_hg38_CDS	98.96%
OMIM_03242022_Gencodev39CDS_hg38	99.08%
RefSeq_11142021_Curated_1stExonCDS_hg38	99.40%
RefSeq_11142021_Curated_CDS_hg38	99.08%

これは、このエクソームパネルとさまざまな公開データベース内のターゲット領域間のカバレッジの比較によるバイオインフォマティクス解析の結果です。製品 [サポートページ](#) から、この設計の詳細な BED ファイルをダウンロードできます。

このガイドでは、Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフローを用いて、DNA から最大 96 種類のユニークデュアルインデックスペアエンド全ゲノムライブラリーを調製する方法を説明します。

このワークフローには、次の特徴があります。

- ビーズでのタグメンテーションという酵素反応を用いて、インプット DNA の断片化とアダプター配列の付加の両方をわずか 15 分で実施します。
- 50 ng 以上のインプット量に革新的なサンプルノーマライゼーションを行うことで、ハイブリダイゼーションの前のライブラリー定量が不要になります。
- 各試薬は十分な液量が含まれており、ほとんどのリキッドハンドラープラットフォームで自動化を実現できます。
- イルミナの推奨プロトコルを用いた場合、全血サンプルまたは唾液サンプルから直接ライブラリーを調製可能です (37 ページの「追加の手順」を参照)。

DNA インプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment プロトコルは、インプット量 10 ng ~ 1000 ng の高品質な二本鎖ヒトゲノム DNA (gDNA) に対応しています。ヒトゲノムの複雑さとサイズを考慮すると、最適な性能を実現するために推奨される最小 gDNA インプット量は 50 ng です。

gDNA の純度を測定し、初期 gDNA サンプルがフェノールやエタノールなどの有機夾雑物を含まないことを確認してください。また、インプット DNA に含まれる EDTA は 1 mM 未満である必要があります。これらの物質はタグメンテーション反応を妨げ、アッセイの失敗や不適切な結果につながる可能性があります。

gDNA インプット量 50 ng 以上

gDNA インプット量 50 ng ~ 1000 ng では、最初の gDNA サンプルの定量とノーマライズは必要ありません。濃縮前のライブラリーの収量（プーリングと濃縮の前）は、ライブラリー調製中に自動的にノーマライズされます。

gDNA インプット量 50 ng 未満

このプロトコルでは、gDNA インプット量が 10 ~ 49 ng の場合、濃縮前の最終ライブラリー収量をノーマライズできません。したがって、濃縮の前後にライブラリーの定量とノーマライゼーションが必要です。

使用する gDNA インプット量が 10 ~ 49 ng の場合、最初の gDNA サンプルを定量して、濃縮前の PCR に必要な PCR サイクル数を決定することを推奨します。蛍光定量を使用した手法で二本鎖 gDNA のインプットを定量してください。NanoDrop やその他の UV 吸収法など、総核酸を測定する方法は使用しないでください。

gDNA 純度の評価

UV 吸収法は gDNA サンプルの純度評価に用いる一般的な方法です。波長 260 nm と 280 nm の吸光度の比がサンプル純度の指標となります。このプロトコルは、高純度の gDNA サンプルであることを示す A260/280 比 1.8 ~ 2.0 の gDNA に対して最適化されています。

サンプル純度の副次的指標には、A260/230 比を使用します。A260/230 比の目標は 2.0 ~ 2.2 です。この範囲外の値は、タグメンテーション反応に影響を与える可能性がある夾雑物の混入を示します。夾雑物による不完全なタグメンテーションは、ライブラリー調製の失敗やクラスター形成の不良、低品質なシーケンスの原因となります。

このような夾雑物には、次のような、酵素反応の一般的阻害剤が含まれます。

- ライブラリー調製酵素と DNA 基質が結合するのを阻害する、DNA にコーティングもしくは結合するタンパク質
- ライブラリー調製酵素に必要な補因子と結合する、EDTA などのキレート剤、塩類、および多糖類
- プロテアーゼなどの他の酵素、およびライブラリー調製酵素を分解またはアンフォールドする洗浄剤やフェノールなどの試薬

上記のテストで得られた比が許容限度を超えている場合、考えられる解決策の 1 つは、スタートの核酸を 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ~ 8.5 で希釈し、ライブラリー調製酵素に影響を与えないか影響が最小限になるような濃度まで夾雑物を希釈することです。もう 1 つの選択肢は、[53 ページの「単一 IPB の手法」](#)に概説されている Illumina Purification Beads を使用した方法で gDNA サンプルを再精製することです。

血液および唾液のインプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment 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のインプットに対応します。血液と唾液に固有のプロトコールの詳細については、[37 ページの「\[オプション\] 血液の溶解」](#)または [39 ページの「\[オプション\] 唾液の溶解」](#)を参照してください。

EDTA チューブの液体全血 10 μ L または Oragene チューブの唾液 30 μ L で開始する場合は、濃縮前のライブラリーのノーマライゼーションが、gDNA インプット量 50 ~ 1000 ng の場合と同じとなります。血液と唾液は不均一性の高いサンプルであるため、ノーマライズされたライブラリーを作製する Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment の性能は溶解サンプルから得られる DNA の総量に依存します。以下の因子は、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します。

- 唾液サンプルの粘性
- 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

サンプルのインプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフローは、さまざまなサンプルから精製された gDNA に対応します。このキットは、以下のプロトコールと試薬キットを用いた場合のサンプルにも対応します。

- Illumina Blood Lysis Protocol (血液) と Flex Lysis Reagent Kit
- Illumina Saliva Lysis Protocol (唾液)

eBLT PCR プログラムの推奨 PCR サイクル数は、サンプルインプットの濃度と品質に基づいて調整します。詳細については、[13 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 2 サンプルのインプットに関する推奨事項

サンプルのインプットタイプ	インプット DNA の定量の必要性	必要な DNA インプット品質	濃縮前のライブラリーの収量のノーマライズ
10 ~ 49 ng のゲノム DNA	あり	A260/280 比 1.8 ~ 2.0 および A260/230 比 2.0 ~ 2.2	なし
50 ~ 1000 ng のゲノム DNA	なし	A260/280 比 1.8 ~ 2.0 および A260/230 比 2.0 ~ 2.2	あり
唾液	なし	該当なし	あり
血液	なし	該当なし	あり

追加リソース

以下のリソースには、調製されたライブラリーの使用について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 Exome 2.0 Plus Enrichment のサポートページ](#)を参照してください。

- 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

表 3 追加の推奨リソース

リソース	説明
『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 & 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。
『Index Adapters Pooling Guide』(文書番号: 1000000041074)	10 塩基対の IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes または 8 塩基対の Nextera XT および Nextera XT v2 Indexes と Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment キットを使用するプーリングのガイドラインと、デュアルインデックスの方法について説明しています。
『Illumina Adapter Sequences』(文書番号: 1000000002694)	イルミナシーケンステクノロジーに用いられている、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。
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes サポートページ	IDT for Illumina DNA/RNA Unique Dual (UD) Indexes に関する情報を提供します。

プロトコール

本章では、Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment プロトコールについて説明します。

- サンプルから解析までの完全なシーケンスワークフローを見直し、製品と実験パラメーターの互換性を確認してください。
- 作業を進める前に、キットの内容を確認して、必要なコンポーネント、機器および消耗品が揃っていることを確認してください。このプロトコールには、ライブラリー調製試薬、濃縮試薬、Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel、IPB、およびインデックスアダプタープレートが必要となります。[42 ページの「サポート情報」](#)を参照してください。
- 規定の分量と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施してください。

プーリングの準備

ライブラリー調製を開始する前に各サンプルのインデックス情報を記録してください。これらのキットに付属のプレプレートされたインデックスアダプタープレートには、ウェルごとに 10 bp の i5 および i7 デュアルインデックスの固有の組み合わせが含まれています。プレートごとに合計で 96 種類のユニークデュアルインデックスの組み合わせがあります。ユニークデュアルインデックスの組み合わせは、プレートごとに異なります。使用するシーケンスシステムと互換性のあるツールについては、[サポートウェブサイトの Compatible Products のページ](#)をご覧ください。

- 少ないプレックス数でのプーリング方法 (2-plex ~ 9-plex) では、『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: 1000000002694) を参照してください。

対応濃縮プレキシティ

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment の試薬は、12-plex 濃縮プレキシティで構成され検証されています。濃縮プレキシティを減らすことも可能ですが、一部のプレキシティでは、追加の濃縮前のライブラリー調製試薬と濃縮プローブパネル試薬が必要です。

標準的でない濃縮プレキシティの場合、適切な濃縮収量を得るには、追加の最適化が必要になることがあります。

- **濃縮プレキシティ**: Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel とのハイブリダイゼーションにおける 1 回の濃縮反応で一緒にプールされる濃縮前のライブラリーの数 (12 を推奨、オプションで 1 ~ 11)。例えば、濃縮前の 12 ライブラリーを組み合わせると、12-plex の濃縮プールが作製されます。
- **濃縮反応**: 反応ごとにプーリングされる濃縮前のライブラリーの数によらない、固有の濃縮反応の回数 (これらのキットでは、8 回分の反応が提供されます)。

濃縮後ライブラリーの合計数を計算するには、反応ごとの濃縮プレキシティに濃縮反応の回数を乗じます。例えば、12-plex の濃縮プールにおける 1 回の濃縮反応で、濃縮後の 12 ライブラリーを含むプールが作製されます。

濃縮前のライブラリーをプーリングする場合、Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment の試薬は、以下の表に示す濃縮反応回数とプレックス数に対応しています。

表 4 サポートされる濃縮プレキシティ

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment の試薬	濃縮反応回数	濃縮プレキシティ
96 Samples キット	8 回の反応	12-plex

ヒントおよびテクニック

プロトコールにセーフ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

- サンプルまたはマスターミックス試薬を添加または移す場合は、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、行ごとまた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

- プロトコールの以下のステップを実行する前に必ず、ゴム製ローラーを用いて粘着シールでシールし、96 ウェルプレートを覆います。
 - 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
- Microseal 'B' シーリングフィルムは -40°C ~ 110°C で使用でき、スカート付きまたはセミスカート付きの PCR プレートに適しています。サーマルサイクラーの使用時や短時間の保管には Microseal 'B' シールを使用してください。
- Microseal 'F' シーリングホイルは -70°C までの温度で使用でき、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) の取り扱い

- ビーズが常にバッファーに浸かった状態にするため、eBLT ストックのチューブは冷蔵庫内でまっすぐに立てて保管します。
- ビーズが懸濁されるまで eBLT ストックのチューブを十分にボルテックスします。ビーズの再沈殿を避けるために、ピペ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または上面に付着した場合は、280 × g で 3 秒間遠心し、その後、ピペティングして懸濁します。
- ビーズを洗浄するとき：
 - プレートに合った磁気スタンドを使用します。
 - 取り外すよう指示があるまで、プレートを磁気スタンドに載せたままにします。
 - プレートを磁気スタンドに載せている間は、プレートを激しく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戻し、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
 - Tagmentation Wash Buffer（TWB）を直接ビーズ上に分注します。
 - 液体がチューブまたはウェルの側面または上面に付着した場合は、280 × g で 3 秒間遠心して液体に戻します。

Tagmentation Wash Buffer（TWB）の取り扱い

- 気泡の発生を最小限に抑えるため、ゆっくりとピペティングします。

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

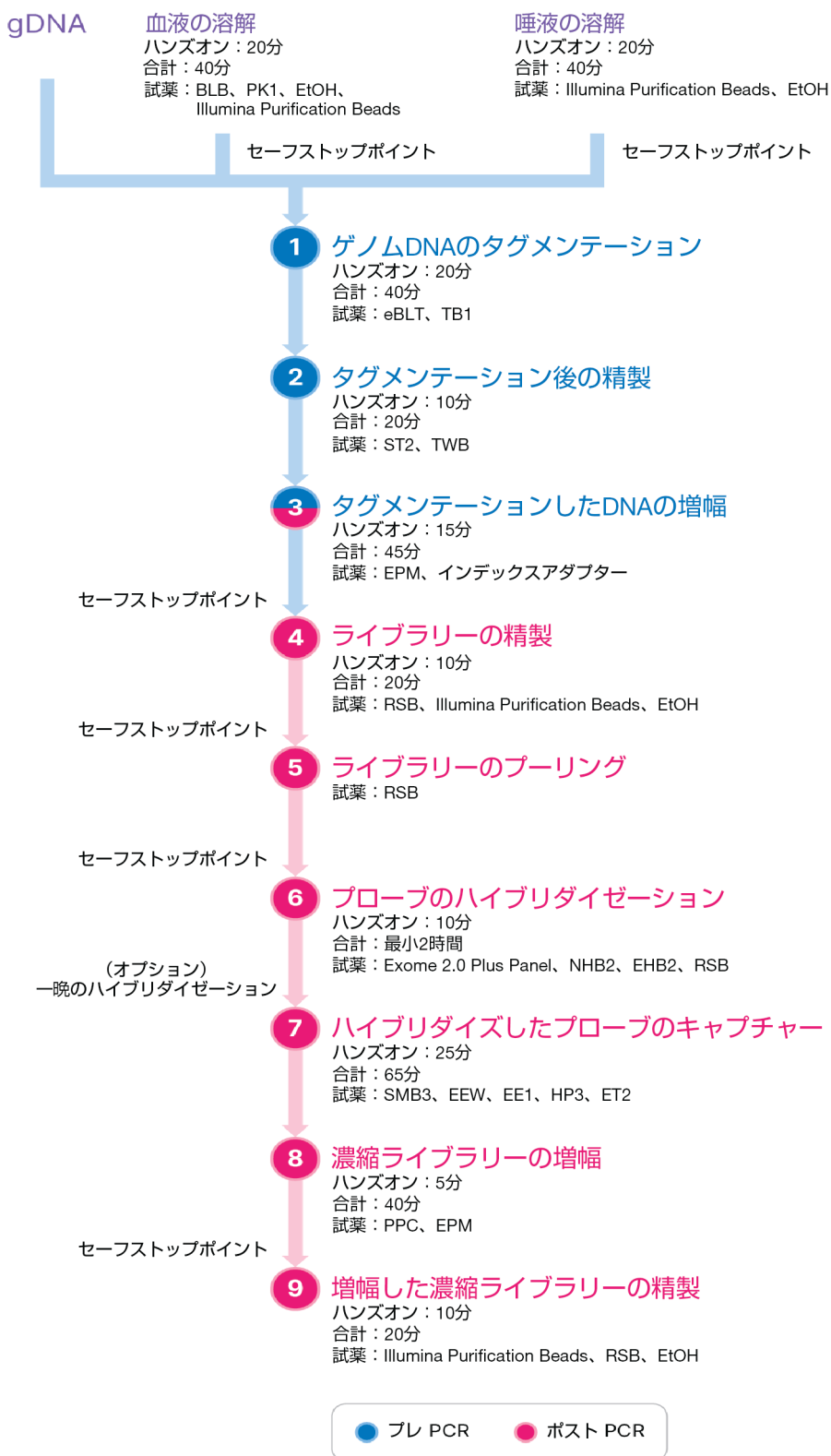
- IDT for Illumina® DNA/RNA UD Indexes は 10 塩基対のインデックスコードを使用します。これは、8 塩基対のインデックスコードを使用する他の Illumina インデックスアダプターとは異なります。使用するシーケンスシステムが 10 塩基対のインデックスコード用に設定されていることを確認してください。NextSeq 500 システムを使用する場合は、10 塩基対のインデックスに適合するようにリード長を変更する必要があります。[Compatible Products](#) ウェブページを参照してください。
- Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment は、IDT® for Illumina® DNA/RNA Unique Dual（UD）または IDT for Illumina Nextera DNA Unique Dual（UD）と互換性があります。
- 各インデックスプレートは使い切りとしてください。

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフロー

以下の図は Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフローを示しています。セーフストップポイントは、ステップ間に示されています。

予想時間は単一の 12-plex 濃縮反応を用いて 12 サンプルを処理する場合に基づいています。

図 1 Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフロー



ゲノム DNA のタグメンテーション

このステップでは、Enrichment Bead-Linked Transposomes (Enrichment BLT、eBLT) を用いてインプット DNA をタグメンテーションします。これは 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

- eBLT (Enrichment Bead-Linked Transposomes) (黄色のキャップ)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96 ウェル PCR プレート
- 1.7 mL マイクロチューブ
- 8 チューブストリップ
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- ピペットチップ
 - 200 μ L マルチチャンネルピペット

! 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、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

試薬について

- eBLT
 - 垂直に立てた状態にして、2°C より高い温度で保管してください。
 - 2°C 未満の温度で保管された eBLT を使用しないでください。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
eBLT (黄色のキャップ)	2°C ~ 8°C	室温で 10 分間インキュベートして室温に戻します。ボルテックスして混合します。ピペッ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. 96ウェルPCRプレートの各ウェルに2 μ L~30 μ LのDNAを添加して、合計インプット量が50 ng~1000 ngになるようにします。
 - DNA量が 30 μ L 未満の場合、DNA サンプルにヌクレアーゼフリー水を添加して総液量が 30 μ L になるようにします。
2. eBLT (黄色いキャップ) 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。
3. 以下の分量を混合し、Tagmentation Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。
 - eBLT (11.5 μ L)
 - TB1 (11.5 μ L)上記の分量を合わせると 1 サンプルあたり 23 μ L の Tagmentation Master Mix となります。正確にピペッティングできるよう、これには試薬が多めに含まれています。
4. Tagmentation Master Mixを十分にボルテックスして懸濁させます。
5. Tagmentation Master Mixを均等に分注します。
【オプション】 8チャンネルのマルチチャンネルピペットを使用する場合は、8チューブストリップを使用します。
6. 20 μ LのTagmentation Master Mixをプレートまたはチューブの各ウェルに移します。
【オプション】 200 μ Lのマルチチャンネルピペットを用いて、20 μ LのTagmentation Master Mixを8チューブストリップからサンプルの入ったプレートの各ウェルに移します。サンプルの列ごとに新しいチップを使用します。
7. 40 μ Lに設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットでピペッティングを10回行ってTagmentation Master MixとgDNAサンプルを混合してから、プレートをシールします。あるいは、プレートをシールし、1600 rpmで1分間攪拌します。
8. 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。
9. TAGプログラムが10°Cの保持温度に達するまで待ってから、プレートを取り外して次に進みます。

タグメンテーション後の精製

このステップでは、eBLT 表面の、アダプターでタグ付けされた DNA を PCR 増幅前に洗浄します。

消耗品

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2) (赤色のキャップ)
- TWB (Tagmentation Wash Buffer)

- 96 ウェルプレート用マグネット
- 8 チューブストリップ
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 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

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
ST2 (赤色の キャップ)	15°C ~ 30°C	沈殿物が見られる場合は、37°Cで10分間加熱し、沈殿物が溶解するまでボルテックスします。
TWB	15°C ~ 30°C	ボルテックスして混合します。

手順

1. 96ウェルPCRプレートを室温で2分間静置します。
2. プレートの各ウェルにST2（赤色のキャップ）を10 μ Lずつ添加します。マルチチャンネルピペットを使用する場合、ST2を8チューブストリップにピペティングしてから、10 μ Lを適切に移します。
3. 50 μ Lに設定した200 μ Lのピペットで、ビーズが懸濁されるまでウェルごとにゆっくりとピペティングを10回行って、その後シールします。あるいは、プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1600 rpmで1分間攪拌します。必要に応じて繰り返します。
4. プレートをシールし、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. **[48サンプル以下]** 次の手順で洗浄します。
 - a. 60 μ Lに設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットで、上清を除去して廃棄します。
 - b. 磁気スタンドから取り外し、ゆっくりピペティングしながら100 μ LのTWBをビーズ上に直接添加します。ゆっくりピペティングすることによってTWBの気泡発生が最小限になり、不正確な分量の吸引や不完全な混合が避けられます。
 - c. ビーズが十分に懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。あるいは、プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1600 rpmで1分間攪拌します。
 - 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に設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットで、上清を除去して廃棄します。
 - f. ステップb~eを2回繰り返し、合計3回洗浄します。

7. **[49サンプル以上]** 次の手順で洗浄します。
 - a. ステップbとcを1列または2列ずつ実行し、すべての列を処理するまで繰り返します。
 - b. 60 μ Lに設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットで、上清を除去して廃棄します。
 - c. 直ちに、ゆっくりピペティングしながら100 μ LのTWBをビーズ上に直接添加します。
 - d. 磁気スタンドから外します。
 - e. ビーズが十分に懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。あるいは、プレートをシールし、1600 rpmで1分間攪拌します。
 - 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. ステップhとiを1列または2列ずつ実行し、すべての列を処理するまで繰り返します。
 - h. 100 μ Lに設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットで、上清を除去して廃棄します。
 - i. 直ちに100 μ LのTWBをビーズ上に直接添加します。
 - j. ステップd~gを2回繰り返し、合計3回洗浄します。
8. ビーズが懸濁されるまで各ウェルをゆっくりとピペティングします。あるいは、プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1600 rpmで1分間攪拌します。
9. プレートをシールして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。「タグメンテーションしたDNAの増幅」の「手順」セクションのステップ4まで、磁気スタンドに載せたままにします。ビーズの過度な乾燥を防ぐため、ウェルにはTWBを残しておきます。

タグメンテーションした DNA の増幅

このステップでは、規定されたサイクル数の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のステップでは、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、フローセルでのライブラリーのクラスター形成に必要な塩基配列を付加します。濃縮のためにプーリングされるライブラリーのインデックスが適切なカラーバランス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。

このプロトコールで使用する互換性のあるインデックスアダプタープレートの一覧については、[42 ページ](#)の「**キットの内容**」を参照してください。

消耗品

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- インデックスアダプタープレート
- Low DNA binding PCR Plate
- ヌクレアーゼフリー水
- 1.7 mL マイクロチューブ
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 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
 - ウェルには 10 μ L より多くのインデックスアダプターが含まれている場合があります。
 - 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切りです。インデックスプレートを使用する際のベストプラクティスについては、6 ページの「[ヒントおよびテクニック](#)」を参照してください。
 - 1 回の実験で 96 インデックスすべてを使用しない場合は、最大で 4 回の凍結融解サイクルでプレートを使用できます。
 - 各インデックスプレートウェルには、インデックス 1 (i7) とインデックス 2 (i5) の固有の調製済み混合物が含まれています。

事前準備

- 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
EPM	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。転倒混和した後、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	室温で融解してから、氷上に置いておきます。

- 以下の eBLT PCR プログラムを、このステップの表に示す適切な PCR サイクル数を指定して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 の変性ステップの前に行う最初の 72°C のインキュベーションに注意してください。ライブラリー調製を正しく行うには、この 72°C のインキュベーションを実施することが不可欠です。
- 98°C で 3 分間
- 以下を X サイクル：
 - 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。

合計実行時間は、9 サイクルでは約 38 分間、12 サイクルでは約 46 分間です。

サンプルのインプット量またはタイプ	PCR サイクル数 (X)
10 ~ 49 ng のゲノム DNA	12
50 ~ 1000 ng のゲノム DNA	9

サンプルのインプット量またはタイプ	PCR サイクル数 (X)
唾液	9
血液	9

手順

- 以下の分量を混合し、PCR Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル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。
- PCR Master Mixをボルテックスした後、280 \times gで10秒間遠心します。
- プレートを磁気スタンドに載せたまま、100 μ Lに設定された200 μ Lのマルチチャンネルピペットで上清を除去して廃棄します。
ウェルの側面に残った気泡はライブラリーに悪影響を及ぼしません。
- 磁気スタンドから外します。
- 直ちに40 μ LのPCR Master Mixを各ウェルのビーズ上に直接添加します。
- 直ちにピペティングを10回行い、ビーズが完全に懸濁されるまで続けます。あるいは、プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1600 rpmで1分間攪拌します。
- サンプルプレートをシールし、280 \times gで10秒間遠心します。
- インデックスアダプタープレートを1,000 \times gで1分間遠心します。
- インデックスアダプタープレートを準備します。
 - [96 サンプル未満] インデックスアダプタープレート上のホイルシールに新しいピペットチップを用いて、処理するサンプルの数だけウェルに穴を開けます。
 - [96 サンプル] インデックスアダプタープレートの上に新しいLow DNA binding PCR Plateを合わせ、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ために使用したLow DNA binding PCR Plateを廃棄します。
- 各サンプルに新しいピペットチップを使用して、10 μ Lの対になったインデックス1 (i7) アダプターとインデックス2 (i5) インデックスアダプターを各ウェルに添加します。
- 40 μ Lに設定されたピペットでピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1600 rpmで1分間攪拌します。ビーズが完全に懸濁されたのを確認してから、次のステップに進みます。
- Microseal 'B'でプレートをシールした後、280 \times gで30秒間遠心します。
- 事前にプログラムした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。

セーフストップポイント

中断する場合は、-25°C ~ -15°Cで保管します（最長 30 日間）。

ライブラリーの精製

このステップでは、増幅されたライブラリーを精製するためにダブルサイズセレクションのビーズ精製手順を行います。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96-well 0.8 mL Polypropylene Deep-well Storage Plate (MIDI プレート) (2)
- 96 ウェル PCR プレート
- 1.7 mL マイクロチューブ
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- Microseal 'F' シーリングホイル

試薬について

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性の高い溶液ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	15°C ~ 30°C	室温で 30 分間静置します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	2°C ~ 8°C	融解し、30 分間かけて室温に戻します。ボルテックスして混合します。

2. サンプルごとに、無水エタノールから 400 μ L の 80% EtOH を用時調製します。20% 多めに調製することを推奨します。

手順

1. プレートシェーカーを使用して、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45 μ Lを新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
4. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
5. gDNA、血液、または唾液の場合は、以下のステップを実行します。
 - i** | 所要時間を短縮するには、53 ページの「単一 IPB の手法」を使用します。ここで2ステップのダブルサイズセレクション精製プロセスを使用すると最適な結果が得られます。さらに迅速化することが重要な場合は、1ステップの精製を実行できます。FFPE サンプルの濃縮を試みる場合、1-plex 濃縮および片側精製を試すことができますが、性能は保証されません。
 - a. 上清の入った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. 上清の入った各ウェルにIPBを88 μ Lずつ添加します。
 - c. MIDIプレートの各ウェルでピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1800 rpmで1分間攪拌します。
 - d. プレートをシールし、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中に、IPBを十分にボルテックスした後、新しいMIDIプレートの各ウェルに20 μ Lずつ添加します。
 - g. シールを取り外し、最初のプレートの各ウェルから上清200 μ Lを、IPBが20 μ L入った新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
 - h. MIDIプレートの各ウェルでピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1800 rpmで1分間攪拌します。
 - i. 最初のプレートを廃棄します。
6. 室温で5分間インキュベートします。
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. ビーズを動かさないように、すべての上清を除去して廃棄します。
9. 次の手順で2回洗浄します。
 - a. プレートを磁気スタンドに載せたまま、用時調製した80% EtOHを混合せずに200 μ L添加します。
 - 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、上清を除去して廃棄します。
10. 20 μ Lピペットで、残存するEtOHを除去して廃棄します。
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ます。
13. 17 μ LのRSBをビーズに添加します。
14. プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1800 rpmで2分間攪拌します。
15. 室温で2分間インキュベートします。
16. 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。
17. 上清15 μ Lを新しい96ウェルPCRプレートに移します。

セーフストップポイント

中断する場合は、プレートに Microseal 'B' シーリングフィルムまたは Microseal 'F' シーリングホイルでシールし、-25°C ~ -15°C で濃縮前のライブラリーを保管します（最長 30 日間）。

濃縮前のライブラリーの定性

濃縮に進む前に、濃縮前のライブラリーの品質確認または定性を実施することを推奨します。

- 濃縮前のライブラリーをチェックしない場合、次の手順を実施し、後でトラブルシューティングが必要になったときに備えて、サンプルを保存しておきます。

トラブルシューティングに備えた保管手順

- 濃縮前の各ライブラリー 1 μ L を、新しい 96 ウェル PCR プレートに移します。
- 濃縮前の各ライブラリーに RSB を 4 μ L ずつ添加します。
- Microseal 'F' シーリングホイルでプレートをシールします。
- 必要に応じて、今後のトラブルシューティングのために -25°C ~ -15°C で保管します（最長 30 日間）。

濃縮前のライブラリーの定性手順

濃縮前のライブラリーは個別に（一度に 1 つのライブラリーを）定性できます。または、濃縮前にプールとして定性することもできます。

- 以下のいずれかの手法を用いて、1 μ L ライブラリーまたはライブラリープールの品質を評価します。
 - ライブラリーまたはライブラリープールに RSB を 1 μ L 添加した後、Advanced Analytical Fragment Analyzer と HS-NGS High Sensitivity 474 キットを用いて液量 2 μ L を解析します。
 - Agilent Technology 2100 Bioanalyzer と DNA 1000 キットを用いて 1 μ L のライブラリーまたはライブラリープールを解析します。

図 2 と 図 3 に示したように、平均断片サイズは 300 bp ~ 400 bp の範囲になり、DNA 断片サイズの分布は 150 bp ~ 1,500 bp の範囲になると想定されます。

図 2 Fragment Analyzer トレースの例

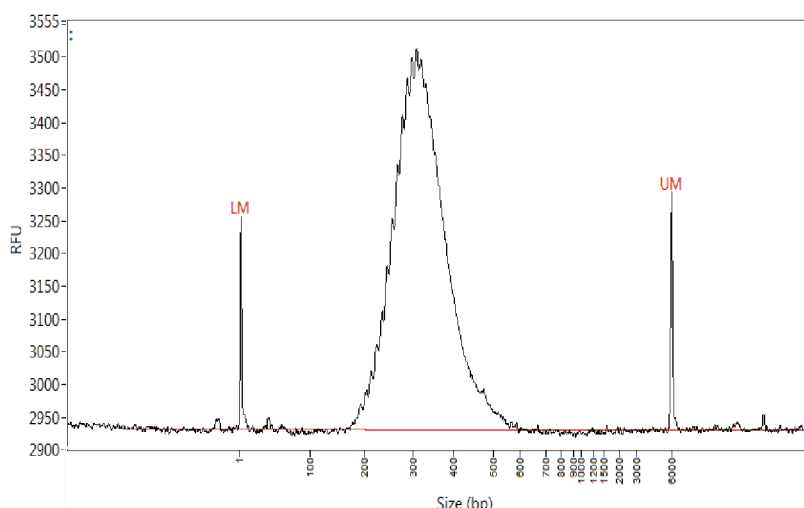
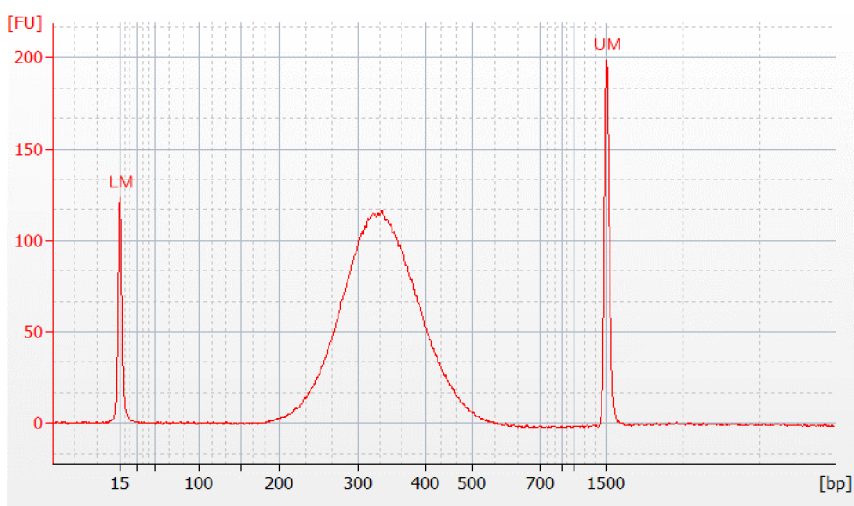


図 3 Bioanalyzer トレースの例



濃縮前のライブラリーのプーリング

このステップでは、DNA ライブラリーとユニークインデックスを混合して、12 ライブラリーを含む1つのプールを作製します。これよりも少ない数の濃縮前のライブラリーをプーリングすることもできますが、追加の最適化を実行することが必要になる場合があります。このキットでは8回の濃縮反応のみに対応しているため、少ない数の濃縮前のライブラリーを使用する場合、濃縮を通じて96サンプルすべてを処理できません。

プーリング方法

液量または質量に基づいてプーリングできます。以下の表で、使用するインプットに適した方法を判断します。

表 5 推奨されるプーリング方法

サンプルインプット	プーリング方法
10 ~ 49 ng の gDNA	質量のみ
50 ~ 1000 ng の gDNA	質量または液量*
唾液	液量
血液	液量

* 50 ng 以上の DNA インプットで開始する場合、濃縮前のライブラリーの収量は、eBLT を使用するタグメンテーション中にノーマライズされます。このノーマライゼーションにより、30 μ L 以下の最終プール液量で濃縮前の各ライブラリーを同じ液量ずつプーリングできます（1 サンプルあたり 250 ~ 500 ng が目標）。

- 濃縮前のライブラリーを定量した後、すべてのサンプルインプットタイプを質量に基づいてプーリングすることで、最適なライブラリーバランスが実現され、ライブラリーあたりのシーケンスリード数を同程度にすることができます。
- 別の実験による調製で作製された濃縮前のライブラリーでは、最終収量が異なる可能性があります。そのため、複数の実験調製で得られたサンプルをプーリングするときは、最適なライブラリーバランスを実現するために質量に基づいてプーリングすることを推奨します。
- 濃縮前のライブラリーが定量されていない場合、液量に基づいてプーリングを行います。これは、50 ng 以上の gDNA インプットで始める場合のみ実施できます。

濃縮前のライブラリーの定量

次のように、ライブラリーの濃度 (ng/ μ L) を決定します。

1. Qubit dsDNA BR Assay Kit で濃縮前の各ライブラリー 1 μ L を定量し、ライブラリーの濃度 (ng/ μ L) を決定します。

サンプルのタイプとインプットに基づいて、次のライブラリー収量が想定されます。

表 6 想定される濃縮前のライブラリー収量

サンプルのインプットタイプ (ng)	濃縮前のライブラリーの収量 (ng)
gDNA 10 ~ 49	≥ 100
gDNA、血液、唾液 50 ~ 1000	≥ 500

- i** | 使用する定量手法に応じて、濃度が異なる場合があります。Qubit dsDNA BR Assay Kit を推奨しますが、別の方法を使用するときは、検証が必要です。

液量に基づいたプーリング

gDNA のインプット量が 50 ng ~ 1000 ng の場合、同じ実験で作製された個々のライブラリーの定量とノーマライズは必要ありません。

最適な性能を実現す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リングしてください。

50 ~ 1000 ng の gDNA、唾液、血液インプットから始める場合、次の標準的なプロトコールを使用して、濃縮前のライブラリーをプーリングできます。

標準的な 12-plex プールの場合：濃縮前の各ライブラリー 2.5 μ L を 1.7 mL マイクロチューブで混合し、最終的なプールの総液量が 30 μ L の 12-plex プールを作製します。

プレックス数の少ないプールを調製する場合（1 プールあたりの濃縮前のライブラリーの数 が 12 未満）：濃縮前の各ライブラリー 2.5 μ L を 1.7 mL マイクロチューブで混合してから、RSB を添加して最終的なプールの総液量を 30 μ L にします。

- 5ページの「[プーリングの準備](#)」で選択したサンプル追跡方法を使用して、このステップでプーリングするライブラリーのインデックスを記録します。
- 次の表に従って、サンプルの液量に基づいて、濃縮前のライブラリーをプーリングします。

ライブラリープールのプレックス数	濃縮前の各ライブラリーの液量 (μ L)	総液量 (μ L)
1-plex	14	30 (16 μ L の RSB を含む)
12-plex	2.5	30

セーフストップポイント

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、-25°C ~ -15°C で保管します（最長 30 日間）。

濃縮前のライブラリーの質量に基づいたプーリング

- 5ページの「[プーリングの準備](#)」で選択したサンプル追跡方法を使用して、このステップでプーリングするライブラリーのインデックスを記録します。
- 各ライブラリーを 1.7 mL マイクロチューブで混合して、次の表に示した 12-plex のプールを作製します。必要に応じて、他のプールについて、同じ手順を繰り返します。

質量に基づいてプーリングする場合、それぞれの最終的な濃縮ライブラリーから同等のシーケンスリードが得られるように、濃縮前の各ライブラリーを常に同じ質量ずつプーリングしてください。

プーリングした 12 ライブラリーの液量が 30 μ L を上回る場合は、プーリングしたライブラリーを 30 μ L に濃縮します。[22 ページの「\[オプション\] プーリングしたライブラリーの濃縮」](#)を参照してください。

最終的なプール液量が 30 μ L 未満の場合、RSB を添加して最終的なプールの総液量を 30 μ L にします。

表 7 質量に基づいたプーリングのガイドライン

サンプル インプット	濃縮前のライブラリーごとのインプット (ng)			最終的な 12-plex プールごとの総質量 (ng)		
	最小	最大	推奨	最小	最大	推奨
10 ~ 49 ng の gDNA	100	500	250 ~ 500	1200	6000	6000
【オプション】 50 ~ 1000 ng の gDNA*	250	500	250 ~ 500	3000	6000	3000 ~ 6000
【オプション】 定量した唾液 および血液 gDNA*	250	500	250 ~ 500	3000	6000	3000 ~ 6000

* 50 ~ 1000 ng のインプット、唾液インプット、または血液インプットから始める場合、質量ではなく液量に基づいて濃縮前のライブラリーをプーリングできます。質量に基づいてプーリングを行った場合、プール内の各濃縮ライブラリーから、より一貫したシーケンスリードが得られます。

【オプション】 プーリングしたライブラリーの濃縮

プーリングした濃縮前のライブラリーの総液量が 30 μ L を上回る場合、プールの最終液量が 32 μ L になるように濃縮する必要があります。そのうち、30 μ L をハイブリダイゼーション液量のために使用します。ここに示すビーズベースの方法を用いて、最終液量を 32 μ L にします。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- [プレート] Microseal 'B' シーリングフィルム
- 以下の容器のいずれか
 - [プレート] 96 ウェル MIDI プレートと 96 ウェル PCR プレート
 - [チューブ] 1.7 mL マイクロチューブ
- 以下のマグネットのいずれか
 - [プレート] Magnetic Stand-96
 - [チューブ] MagneSphere Technology Magnetic Separation Stands (12 ポジション、1.7 mL)。プール液量が 178 μ L 以上のときに MIDI プレートの代わりに使用。

試薬について

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性の高い溶液ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	15°C～30°C	室温で30分間静置します。ボルテックスおよび転倒混和します。懸濁したIPBビーズ。
RSB	2°C～8°C	30分間かけて室温に戻します。ボルテックスして混合します。

2. サンプルごとに、無水エタノールから400 µLの80% EtOHを用時調製します。20%多めに調製することを推奨します。

手順

1. サンプルチューブを280 × gで1分間遠心します。
2. 新しいMIDIプレートの対応するウェルまたは新しい1.7 mLマイクロチューブにサンプルを移します。

i | プール液量が178 µL以上の場合、MIDIプレートウェルから試薬があふれるのを防ぐために、MIDIプレートウェルの代わりに1.7 mLマイクロチューブを使用します。
3. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
4. プール液量の2.5倍のIPBを各ウェルまたはマイクロチューブに添加して、次のように十分に混合します。例えば、ライブラリープールの液量が100 µLの場合、250 µLのIPBをウェルに添加します。
 - **【プレート】** プレートをシールし、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、高速で10秒間ボルテックスします。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10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5分間）待ちます。
8. 各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去して廃棄します。
9. 次の手順で2回洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルまたはチューブに用時調製した80% EtOHを200 µLずつ添加します。

- b. 30秒間室温でインキュベートします。
 - c. 200 μ Lに設定されたピペットで、各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去し廃棄します。
10. 20 μ Lピペットで、残存する80% 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. 次のように十分に混合します。
 - **【プレート】** プレートをシールし、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、高速で10秒間ボルテックスします。3回繰り返します。
 14. サンプル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 \times gで10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. [24ページの「プローブのハイブリダイゼーション」](#)で、プロトコルを再開します。

セーフストップポイント

中断する場合は、次のようにします。

プレートを Microseal 'B' シーリングフィルムまたは Microseal 'F' シーリングホイルでシールするか、1.7 mL マイクロチューブにキャップをし、-25°C ~ -15°Cで保管します（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、濃縮前のライブラリー DNA のターゲット領域をエクソームキャプチャープローブと結合させます。

i | このプロトコルでは、ハイブリダイゼーション反応あたりに必要なエクソームプローブは、わずか 4 μ L であり、これはイルミナの他の濃縮プロトコルよりも少ない分量です。

消耗品

- EHB2 (Enrich Hyb Buffer 2)
- Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel (緑色のキャップ)
- NHB2 (Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (青色のキャップ)
- RSB (Resuspension Buffer)
- ヌクレアーゼフリー水

- 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】 Microseal 'B' シーリングフィルム
 - 【チューブ】 8 チューブストリップキャップ

試薬について

- 保管中に NHB2 が沈殿して分離します。最初に使用する前に、NHB2 の調製手順に従ってください。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	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。 結晶や混濁が見られる場合、ボルテックスを繰り返すか上下にピペティングして、溶液が透明になるまで十分に混合します。
Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel	-25°C ~ -15°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。 ハイブリダイゼーション反応ごとに、総液量 4 µL のプローブを使用します。
NHB2 (青色の 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、50°C に予熱します。 最大速度で 10 秒間のボルテックスをそれぞれ 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。 結晶や混濁が見られる場合、ボルテックスを繰り返すか上下にピペティングして、溶液が透明になるまで十分に混合します。沈殿物の再生成を避けるため、温かいうちに使用します。
SMB3	2°C ~ 8°C	IEE (イルミナエクソーム濃縮) -HYB プログラムに 1.5 時間保持した後、直ちに次の手順に進む場合、室温に戻します。 保持時間を延長する場合、IEE (イルミナエクソーム濃縮) -HYB プログラムが終了する前に、少なくとも 2 時間かけて室温に戻します。
EEW (アンバー チューブ)	-25°C ~ -15°C	IEE (イルミナエクソーム濃縮) -HYB プログラムに 1.5 時間保持した後、直ちに次の手順に進む場合、室温に戻します。

2. 次のIEE（イルミナエクソーム濃縮）-HYBプログラムをサーマルサイクラーに保存します。

i | IEE-HYB プロトコールは、Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler と 96-Deep Well Reaction Module、または Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2 を使用して、最適化され検証されています（49 ページの「機器」の表を参照）。別の機器を使用する場合、同等の性能は保証されません。

- 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 100 µL に設定します。
- 98°Cで 5 分間
- 初回サイクルを 97°Cで開始し、1 サイクルごとに 2°C ずつ温度を下げる工程を 1 分間、18 サイクル行います。
- 62°Cで 1.5 時間保持します。
 - [オプション] 性能を多少向上させるため、または利便性のために、62°Cでのハイブリダイゼーション保持時間を 1.5 時間から 16 時間に延ばすことができます。

合計実行時間は約 2 時間です。

手順

1. 新しいPCRプレートの各ウェルまたは8チューブストリップに、以下の分量を以下の記載順に添加します。NHB2とEHB2のマスターミックスを作製すると、濃縮性能に悪影響が及びます。
 - 濃縮前のライブラリーのプール（30 µL）
 - NHB2（青色のキャップ）（50 µL）
 - Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel（4 µL）
 - ヌクレアーゼフリー水（6 µL）
 - EHB2（10 µL）
2. 90 µLに設定されたピペットで各ウェルのピペッティングを10回行って混合します。
3. 次のように遠心します。
 - [プレート] Microseal 'B' でプレートをシールした後、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、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サンプルプレートまたはチューブを置き、IEE（イルミナエクソーム濃縮）-HYBプログラムを実行します。
5. IEE（イルミナエクソーム濃縮）-HYBプログラムの温度保持時間が終了したら、直ちに次の手順に進みます。
 - **!** | ハイブリダイゼーション反応の温度が室温未満に低下すると、沈殿が生じます。ハイブリダイゼーションからキャプチャーへ直接進んでください。

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、Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) を用いて、ライブラリー内の対象となるターゲット領域にハイブリダイズした Exome 2.0 Plus プローブをキャプチャーします。

消耗品

- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- EEW (Enhanced Enrichment Wash) (アンバーキャップ)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- HP3 (2N NaOH)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- 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 MIDI プレートと 96 ウェル PCR プレート
 - [チューブ] 1.7 mL マイクロチューブと 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] Microseal 'B' シーリングフィルム
 - [チューブ] 8 チューブストリップキャップ
- 以下のマグネットのいずれか
 - [プレート] Magnetic Stand-96
 - [チューブ] MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands (12 ポジション、1.7 mL)

試薬について

- EEW
 - 室温に達した後、混濁する場合があります。
 - 黄色に見える場合があります。
 - 説明のとおり、使用前に加熱してください。
 - 遠心しないでください。
- SMB3
 - この手順では、Illumina Purification Beads ではなく、SMB3 を必ず使用してください。
 - SMB3 は、使用前に室温にする必要があります。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
SMB3	2°C ~ 8°C	2 時間静置し室温に戻します。使用前にボルテックスして混合します。
EEW (アンバーチューブ)	-25°C ~ -15°C	2 時間静置し室温に戻します。30 秒間のボルテックスをそれぞれ 3 回繰り返します。 この試薬は手順実施中は加熱されます。
EE1	-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。使用する前に短時間遠心します。
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。使用する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。使用する前に短時間遠心します。

2. MIDIヒートブロックインサートを取り付けたマイクロヒーティングシステムを予熱し、サンプルプレートを62°Cまでインキュベートします。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を予熱することもできます。

手順

キャプチャー

1. プーリングした濃縮ライブラリーのサンプルプレートまたはチューブを280 × gで30秒間遠心します。
2. 100 µLに設定されたピペットを用いて、96ウェル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、各濃縮プールを新しいMIDIプレートの対応するウェルまたは新しい1.7 mLマイクロチューブに移します。
3. 250 µLのSMB3を各ウェルまたはチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - **【プレート】** プレートをシールし、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、高速で 10 秒間、それぞれ 3 回ボルテックスします。
4. 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にサンプルプレートまたはチューブを載せ、リッドを閉じ、62°Cで15分間インキュベートします。
プーリングされたライブラリー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. 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にEEW（アンバーチューブ）を横にして載せ、62°Cまで予熱します。または、ステップ4のインキュベーション中に、MIDIヒートブロックインサートにあるMIDIプレートの上または1.7 mLマイクロチューブの脇にEEWを載せます。29ページの「洗淨」のステップ2まで、EEWを加熱し続けます。
6. 直ちにプレートまたはチューブを280 × gで30秒間遠心します。

7. 直ち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 μ Lに設定されたピペットで、各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去して廃棄します。

洗浄

1. 磁気スタンドから外します。
2. 予熱したEEW（アンバーチューブ）200 μ Lを各ウェルまたはマイクロチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - 【プレート】 シールし、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まで下げます。
 - 【チューブ】 チューブにキャップをしてから、高速で10秒間、それぞれ3回ボルテックスします。
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. 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にサンプルプレートまたはチューブを載せ、リッドを閉じ、62°Cで5分間インキュベートします。
5. 【チューブ】 3秒間遠心します。
6. 直ちにプレートまたはマイクロチューブ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。
7. 200 μ Lに設定されたピペットで、各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去して廃棄します。
8. ステップ1~7をさらに2回繰り返し、合計3回洗浄します。

移動洗浄

1. プレートまたはチューブを磁気スタンドから取り外します。
2. 予熱したEEW（アンバーチューブ）200 μ Lを各ウェルまたはチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - 【プレート】 シールし、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まで下げます。
 - 【チューブ】 チューブにキャップをしてから、高速で10秒間、それぞれ3回ボルテックスします。
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1.7 mLマイクロチューブに移します。
 - ❗ | 試薬を移すことで、下流PCRの妨げになる可能性がある試薬の残存を最小限に抑えることができます。
4. 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にサンプルプレートまたはチューブを載せ、リッドを閉じ、62°Cで5分間インキュベートします。
5. 【チューブ】 3秒間遠心します。
6. 直ち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に設定されたピペットで、各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去して廃棄します。

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秒間置いておきます。
10. 20 µLのピペットを用いて、各ウェルまたはチューブに残っている液体を除去して廃棄します。
11. ビーズの過度の乾燥やライブラリー収量が減少するのを防ぐために、直ちに溶出に進みます。

溶出

1. 以下の分量を混合し、Elution Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。
 - EE1 (28.5 µL)
 - HP3 (1.5 µL)上記の分量には試薬が多めに含まれています。
2. マスターミックスをボルテックスした後、280 × gで10秒間遠心します。
3. サンプルプレートまたはチューブを磁気スタンドから取り外します。
4. 23 µLのElution Master Mixを各ウェルまたはチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - 【プレート】 プレートをシールし、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から、高速で10秒間、それぞれ3回ボルテックスします。
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MIDIプレートまたは1.7 mLマイクロ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8チューブストリップに移します。
9. 上清21 µLの入った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と10回ピペッティングして混合します。
11. サンプルプレートまたはチューブを280 × gで30秒間遠心します。

エクソーム濃縮ライブラリープールの増幅

このステップでは、PCRを用いて、濃縮された全エクソームライブラリープールを増幅します。

消耗品

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- 【プレート】 Microseal 'B' シーリングフィルム
- 【チューブ】 8 チューブストリップキャブ

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

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

2. 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 μ L に設定します。
 - 98°Cで 45 秒間
 - 以下を 12 サイクル：
 - 98°Cで 30 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。
 合計実行時間は約 35 分間です。

手順

1. 各ウェルまたはチューブにPPCを5 μ Lずつ添加します。
2. 20 μ LのEPMを各ウェルまたはチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - **【プレート】** プレートをシールし、1200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - **【チューブ】** ピペッティングを 10 回行って混合してから、8 チューブストリップにキャップをします。
3. プレートまたはストリップチューブを280 \times 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。

セーフストップポイント

中断する場合は、2°C～8°Cで保管します（最長 2 日間）。または、10°Cで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）。

増幅したエクソーム濃縮ライブラリープールの精製

このステップでは、IPB を用いて、増幅したエクソーム濃縮ライブラリープールを精製し、不要な生成物を除去します。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)

- RSB (Resuspension Buffer)
- 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- [プレート] Microseal 'B' シーリングフィルム
- 以下の容器のいずれか
 - [プレート] 96 ウェル MIDI プレートと 96 ウェル PCR プレート
 - [チューブ] 1.7 mL マイクロチューブ
- 以下のマグネットのいずれか
 - [プレート] Magnetic Stand-96
 - [チューブ] MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands (12 ポジション、1.7 mL)

試薬について

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性の高い溶液ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	15°C ~ 30°C	室温で 30 分間静置します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	2°C ~ 8°C	30 分間かけて室温に戻します。ボルテックスして混合します。

2. サンプルごとに、無水エタノールから 400 μ L の 80% EtOH を用時調製します。20% 多めに調製することを推奨します。

手順

1. PCR サンプルを 280 \times g で 30 秒間遠心します。
2. PCR プレートの各ウェルまたは 8 チューブストリップから 45 μ L を新しい MIDI プレートの対応するウェルまたは新しい 1.7 mL マイクロチューブに移します。
3. 40.5 μ L の IPB を各ウェルまたはチューブに添加して、次のように十分に混合します。
 - [プレート] プレートをシールし、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、高速で 10 秒間ボルテックスします。2 回繰り返します。
4. 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。

5. 280 × gで1分間遠心します。
6. 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。
7. 85 µLに設定されたピペットで、各ウェルまたはチューブから、すべての上清を除去して廃棄します。
8. 次の手順で2回洗浄します。
 - a. プレートを磁気スタンドに載せたまま、用時調製した80% EtOHを混合せずに200 µL添加します。
 - b. 30秒間室温でインキュベートします。
 - c. ビーズを動かさないように、上清を除去して廃棄します。
9. 20 µLのピペットを用いて、各ウェルまたはチューブに残っているEtOHを除去して廃棄します。
10. 磁気スタンド上で5分間風乾します。
11. 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。
12. 次のように十分に混合します。
 - **【プレート】** プレートをシールし、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から、高速で 10 秒間、3 回ボルテックスします。2 回繰り返します。
13. 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。
14. 280 × g で30秒間遠心します。
15. 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。
16. 上清30 µLを96ウェルPCRプレートまたは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1.7 mLマイクロチューブに移します。

セーフストップポイント

中断する場合は、プレートを Microseal 'B' シーリングフィルムまたは Microseal 'F' シーリングホイルでシールするかチューブにキャップをし、-25°C ~ -15°Cで保管します（最長 7 日間）。

エクソーム濃縮ライブラリーのチェック

次の手順を実施して、各エクソーム濃縮ライブラリーの濃度と品質をチェックします。

1. Qubit dsDNA BR Assay Kitを使用して濃縮ライブラリー1 µLを解析し、ライブラリー濃度を定量します。
2. Agilent Technology 2100 BioanalyzerとHigh Sensitivity DNAキットを用いて、1 µLのプーリングされたライブラリーまたは個々のライブラリーを解析します。
平均断片サイズは約350 bpになり、DNA断片サイズの分布は約200 bp~1,000 bpの範囲になると想定されます。

図 4 Nioanalyzer によるトレース例 1

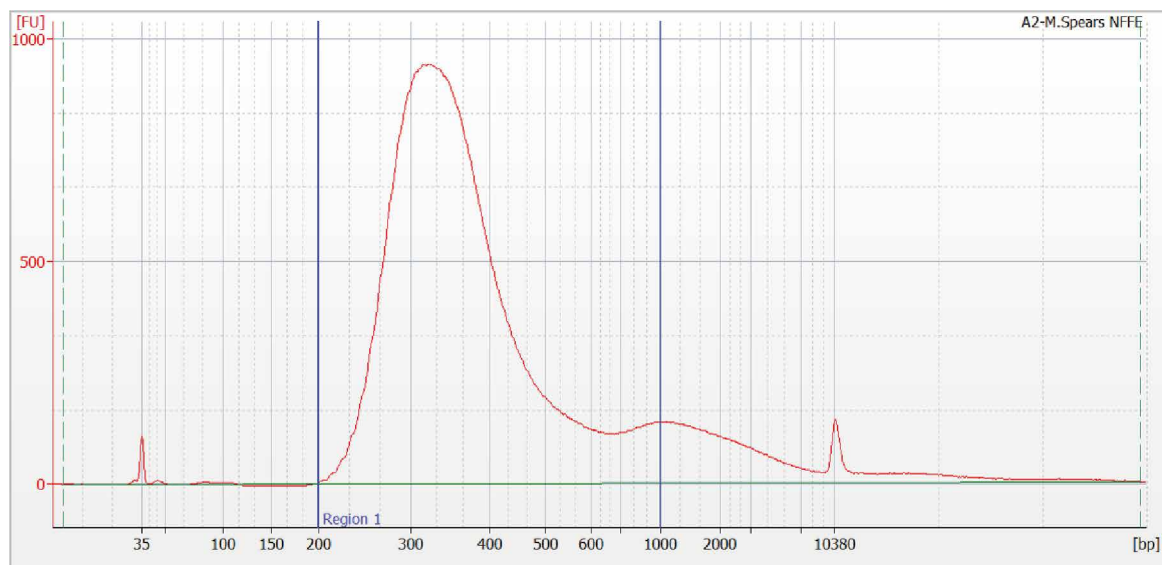
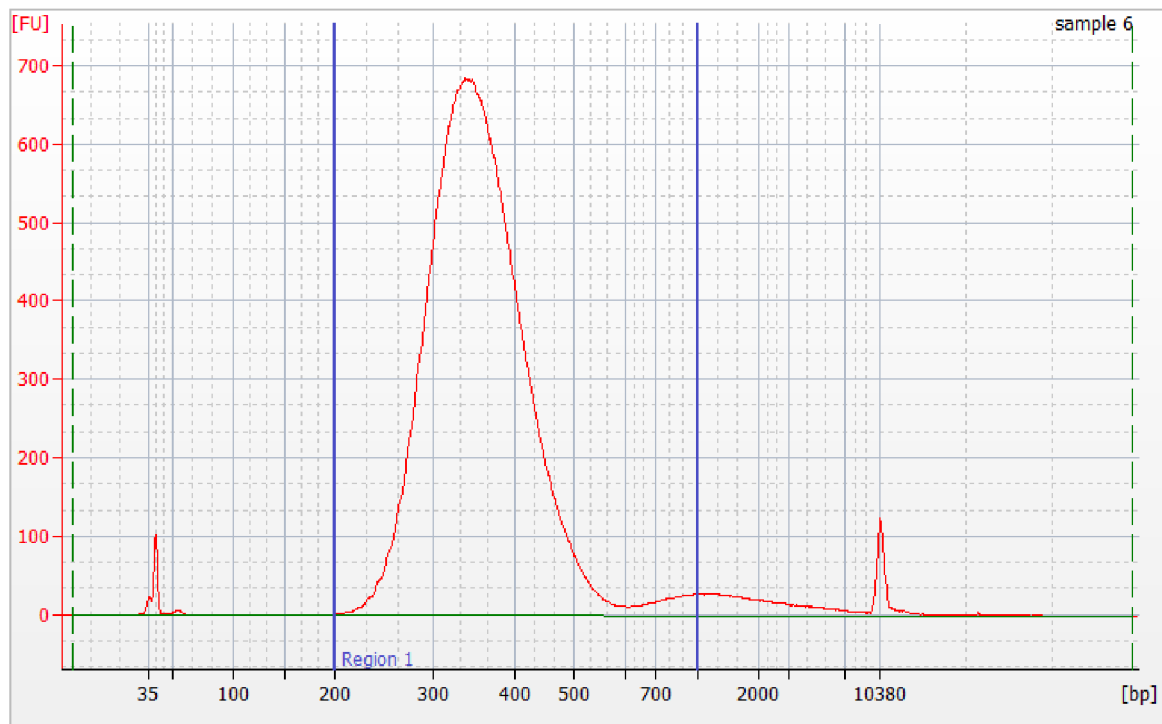


図 5 Nioanalyzer によるトレース例 2



ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップは、段階希釈の最初のステップであり、プーリング済みエクソーム濃縮ライブラリーを、使用するシーケンスシステムの開始濃度に希釈します。開始濃度への希釈後に、プーリング済みエクソーム濃縮ライブラリーは、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。

1 リードあたり 101 サイクル (2 × 101) で 1 インデックスリードあたり 10 サイクルのペアエンドランをセットアップすることを推奨します。追加の重複リードまたは追加のローカバレッジが必要な場合は、最大 2 × 126 または 2 × 151 をシーケンスできますが、必須ではありません。

1. 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算出します。

- Bioanalyzer で定性評価されたライブラリーの場合は、そのライブラリーで得られた平均サイズを使用します。
- それ以外の定性評価法の場合は、350 bp を平均ライブラリーサイズとして使用します。

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{average library size (bp)}} = \text{Molarity (nM)}$$

2. モル濃度を用いて、ライブラリーを使用システムの開始濃度に希釈するのに必要なRSBとプーリング済み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 4000 および HiSeq 3000 システム	2 ~ 3	150 ~ 200
HiSeq 2500 および HiSeq 2000 システム (高出力モード)	2	16 ~ 18
NextSeq 550 および NextSeq 500 システム	2	1.4 ~ 1.5
NextSeq 1000 または 2000 システム	2	1,000
NovaSeq 6000 システム (Standard ワークフロー)	2	175 ~ 185

3. 次のように、RSBでライブラリーを希釈します。

- **プールとして定量したライブラリー**：プールを使用システムの開始濃度に希釈します。
- **個別に定量したライブラリー**：各ライブラリーを使用システムの開始濃度に希釈します。希釈後の各ライブラリーから 10 µL を 1 つのチューブにまとめ、マルチプレックスライブラリープールを作製します。

4. 使用システムの変性希釈手順に従って、最終ローディング濃度に希釈します。

- NovaSeq 6000 システムの場合、変性手順の詳細については『Denature and Dilute Libraries Guide』を参照してください。
- HiSeq 4000 および HiSeq 3000 システムの場合、試薬調製手順の詳細については cBot 2 または cBot システムガイドを参照してください。
- 1,000 pM でローディングしている NextSeq 1000 または 2000 システムの場合、変性手順の詳細についてはシステムガイドを参照してください。

- それ以外のすべてのシステムの場合は、各システムの『Denature and Dilute Libraries Guide』を参照してください。

最終ローディング濃度はあくまでも初回の目安であり、一般的なガイドラインです。その後のシーケンスランとフローセル最適濃度の検討により、使用するワークフローと定量手法に合わせて濃度を最適化してください。

追加の手順

本章では、Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフロー内のオプション手順について説明します。

[オプション] 血液の溶解

血液サンプルのインプットと Flex Lysis Reagent Kit で Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフローを実行するときは、このプロトコールを使用します。このプロトコールは EDTA 採血管に採取された新鮮全血で検証済みです。血液は 4°C で保存し、3 日以内に処理します。凍結血液の使用は検証されていないため、推奨できません。

このプロトコールでは、血液溶解ステップの終了時に 100 ng を超える DNA アウトプットが生成されることが想定されます。

! 血液は感染症の原因となる可能性があります。施設で定められた手順に従って、血液サンプルを安全に処理してください。溶解プロトコールでは、後続のステップに進む前に全血サンプルを完全に溶解します（加熱インキュベーションのステップ後、褐色に変化）。これにより、血液由来病原体が除去され、サンプルが生物学的有害物質でなくなります。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)
- BLB (Blood Lysis Buffer)
- PK1 (Proteinase K)
- 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- EDTA 採血管 (採血用)
- 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

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性が高い液体ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	15°C～30°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
BLB	15°C～30°C	凍結している場合、室温で融解します。沈殿物が見られる場合は、37°Cで10分間加熱し、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。

2. 無水エタノールから80% EtOH 150 µLを用時調製します。20%多めに調製します。
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。
 - 反応量を70 µLに設定します。
 - 56°Cで10分間

手順

1. 以下の分量を混合し、Lysis Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。
 - BLB (8.4 µL)
 - PK1 (2.4 µL)
 - ヌクレアーゼフリー水 (37.2 µL)
 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. Lysis Master Mixをボルテックスし、遠心します。
3. EDTAコレクションチューブを10回転倒混和します。
4. 血液10 µL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Lysis Master Mixを40 µLずつ添加します。
6. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
7. ウェルにIPBを20 µL添加します。
8. 50 µLに設定されたピペットでゆっくりとピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
9. 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。
溶解反応後の暗褐色の血液のため、液体は透明になりません。
ビーズは5分後に移動します。
11. ビーズを動かさないように、上清を除去して廃棄します。

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. ウェルに用時調製した80% EtOHを150 μ L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. ピペットで80% EtOHを除去して廃棄します。
16. 20 μ Lピペットで、残存するEtOHをすべて除去して廃棄します。
17. プレートを磁気スタンドから取り外します。
18. ヌクレアーゼフリー水を32 μ L添加して、ピペッティングで懸濁させます。
19. プレートをシールします。
20. プレートを280 \times gで30秒間遠心します。
21. シールを取り外し、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。
22. 上清30 μ Lを新しい96ウェルPCRプレートに移します。
23. 中断しない場合は、直ちに10ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」のステップ3に進みます。

セーフストップポイント

10ページの「ゲノムDNAの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 Microseal 'B' シーリングフィルムでシールし、プレートを 2°C ~ 8°C で保管します（最長 3 日間）。

[オプション] 唾液の溶解

唾液サンプルのインプットで Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフローを実行するときは、このプロトコールを使用します。このプロトコールは Oragene DNA Saliva コレクションチューブに採取された唾液でのみ検証済みです。唾液はコレクションチューブ内の Oragene DX Solution と混合されると、室温で安定します。

このプロトコールでは、100 ng を超える DNA アウトプットが生成されることが想定されます。

! | 唾液は感染症の原因となる可能性があります。施設で定められた手順に従って、唾液サンプルを安全に処理してください。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)
- 96 ウェル PCR プレート
- 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー水
- Oragene DNA コレクションチューブ (唾液サンプル採取用)

試薬について

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性が高い液体ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
Oragene DNA コレクション チューブ内の唾液サンプル	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インキュベーター（DNA Genotek による推奨）を用いて 50°C で 1 時間以上インキュベートし、細胞を溶解します。熱処理後、室温で保管します。室温での Oragene サンプルまたは唾液サンプルの長期保管と保証の詳細については、DNA Genotek のウェブサイトを参照してください。
IPB	15°C ~ 30°C	ボルテックスおよび転倒混和します。

2. サンプルごとに、無水エタノールから 150 μ L の 80% EtOH を用時調製します。20% 多めに調製します。

手順

1. サンプルの数だけ、ヌクレアーゼフリー水 20 μ L を 96 ウェル PCR プレートの 1 ウェルに添加します。
2. 熱処理した Oragene DNA コレクション チューブをボルテックスします。
3. 唾液サンプル 30 μ L をチューブから水の入ったウェルに移します。
4. ゆっくりとピペティングして混合します。
粘性の高いサンプルでは、正確にピペティングできるよう、広口径のピペットチップを使用します。
5. IPB をボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
6. ウェルに IPB を 20 μ L 添加します。
7. 50 μ L に設定されたピペットでゆっくりとピペティングを 10 回行って混合します。
8. 室温で 5 分間インキュベートします。
9. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
10. ビーズを動かさないように、すべての上清を除去して廃棄します。

11. 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戻し、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
12. ウェルに用時調製した80% EtOHを150 μ L添加します。
13. 磁気スタンド上で30秒間インキュベートします。
14. 20 μ Lピペットで、残存するEtOHをすべて除去して廃棄します。
15. プレートを磁気スタンドから取り外します。
16. ヌクレアーゼフリー水を32 μ L添加して、ピペッティングで懸濁させます。
17. プレートをシールし、280 \times gで30秒間遠心します。
18. シールを取り外し、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。
19. 上清30 μ Lを新しい96ウェルPCRプレートに移します。
20. 中断しない場合は、直ちに10ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」のステップ3に進みます。

セーフストップポイント

プレートを Microseal 'B' シーリングフィルムでシールし、2°C～8°Cで保管します（最長3日間）。

サポート情報

本ガイドで説明したプロトコールは、ユーザーが本章の内容をレビューし、プロトコールの内容を確認して、必要な消耗品および機器をすべて揃えていることを前提としています。

キットの内容

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment プロトコールを完了するには、ライブラリー調製試薬やライブラリー濃縮試薬、エクソームパネル、精製ビーズおよびサイズ選択ビーズ、およびインデックスアダプターが必要であり、これらはすべて、ここに記載されているフルキットに含まれています。必要なインデックスアダプターの数は、実験に固有のインデックスの付いたサンプル数に依存します。サンプルのインプットタイプとシーケンシングの要件によって、プロトコールに追加的なオプションの消耗品が必要となる場合があります。

項目	キットのオプション	当社カタログ番号
ライブラリー調製および濃縮試薬	Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment Kit, Tagmentation Set B (96 Samples, 12-plex)	20077595
	Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment Kit, Tagmentation Set D (96 Samples, 12-plex)	20077596
[オプション] 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 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
[オプション] 血液の溶解 ¹	Flex Lysis Reagent Kit (96 samples)	20018706
[オプション] 追加の試薬	Illumina Adapter Blocking Reagents (12 reactions)	20024144
	Illumina Adapter Blocking Reagents (48 reactions)	20024145

¹ 精製された血液 gDNA ではなく、新鮮全血サンプルからプロトコールを開始するときに必要です。

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment : キットの内容

Illumina DNA/RNA Prep - IPB Tagmentation Buffers、15℃～30℃で保管

このバッファーは2℃～8℃で出荷されます。適切な性能を確保するため、試薬は表記されている温度ですぐに保管してください。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
4	ST2	Stop Tagment Buffer 2	赤色
1	TWB	Tagmentation Wash Buffer	透明
2	IPB	Illumina Purification Beads	赤色

Illumina DNA Prep - Tagmentation (S) Beads、2℃～8℃で保管

ビーズが常にバッファー内に沈むように、eBLT ストックのチューブはまっすぐに立てて保管します。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
4	eBLT	Enrichment Bead-Linked Transposomes	赤色
2	RSB	Resuspension Buffer	赤色

Illumina DNA/RNA Prep - Tagmentation PCR Reagents、-25℃～-15℃で保管

以下の試薬は2℃～8℃で出荷されます。適切な性能を確保するため、試薬は表記されている温度ですぐに保管してください。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
4	TB1	Tagmentation Buffer 1	透明
4	EPM	Enhanced PCR Mix	透明

Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel、-25℃～-15℃で保管

以下の試薬は凍結温度で出荷されます。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
1	該当なし	Twist BioScience for Illumina Exome 2.0 Plus Panel	緑色

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

以下の試薬は4°Cで出荷されます。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
2	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	透明
1	RSB	Resuspension Buffer	透明
1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明
1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明

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。適切な性能を確保するため、試薬は表記されている温度ですぐに保管してください。

チューブ数量 (96 Samples)	略語	試薬名	チューブキャップ色
1	EE1	Enrichment Elution Buffer 1	透明
4	EEW	Enhanced Enrichment Wash	アンバー
1	PPC	PCR Primer Cocktail	透明
1	HP3	2 N NaOH	透明
1	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers	青色
1	EPM	Enhanced PCR Mix	透明

IDT for Illumina DNA UD Indexes、-25°C～-15°Cで保管

i | 同梱されているインデックスセットは、注文したキットに含まれているものがSet BかSet Dかによって異なります。

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。

説明

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

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

【オプション】 IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes、-25℃～ -15℃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。

説明

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

【オプション】 IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes、-25℃～ -15℃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。

説明

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

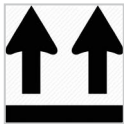

【オプション】 Flex Lysis Reagent Kit

以下の試薬は -25℃～ -15℃で出荷されます。適切な性能を確保するため、試薬は表記されているチューブ温度ですぐに保管します。

数量	略語	試薬名	チューブキャップ色	保管温度
4	BLB	Blood Lysis Buffer	透明	15℃～ 30℃
4	PK1	Proteinase K	透明	-25℃～ -15℃

記号説明

次の表に、配送パッケージ、消耗品または消耗品のパッケージに関する記号を示します。

記号	説明
	箱の上面を示します。
	内容物が壊れやすいため、取り扱いに注意が必要であることを示します。

記号	説明
	保管温度範囲（摂氏）。表記された範囲内で消耗品を保管してください。 ¹
	消耗品の使用期限。最良の結果を得るには、この日付より前に消耗品を使用してください。
	製造者（イルミナ）を示します。
	使用目的は研究に限定されます（RUO）。
	消耗品を識別することができる部品番号を示しています。 ²
	消耗品が製造されたバッチまたはロットを特定するためのバッチコードを示します。 ¹
	健康に害を及ぼすことを示します。

¹ 室温は配送温度と異なる可能性があります。

² REF は個々のコンポーネントを識別するのに対し、LOT はコンポーネントが属するロットまたはバッチを識別します。

消耗品および機器

プロトコールを開始する前に必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。一部の消耗品や機器は特定のワークフローにのみ必要です。それらの消耗品および機器は別の表に記載されています。本プロトコールは、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 µL ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µL 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 µL 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 µL ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µL 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 µL 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 µL ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µL 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 µL 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 µL ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µL 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 Deep well Storage Plate (MIDI プレート)	Thermo Fisher Scientific、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
Eppendorf twin.tec™ 96 Well Low DNA Binding PCR Plates、スカート付き (または同等品)	Eppendorf、カタログ番号：0030129512
Hard-Shell 96 ウェル PCR プレート	Bio-Rad、カタログ番号：HSP-9601
Microseal 'B' シーリングフィルム	Bio-Rad、カタログ番号：MSB-1001
Microseal 'F' シーリングホイル	Bio-Rad、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、0.2 mL	一般的なラボ用品サプライヤー

消耗品	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、カタログ番号：89094-658
分子生物学用エタノール 200 プルーフ (純粋) (500 mL)	Sigma-Aldrich、製品番号：E7023
ヌクレアーゼフリー水	一般的なラボ用品サプライヤー
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：Q32850 または Q32853
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：Q32856
定量手法に応じて、以下のキットのいずれか <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) 	機器に応じて、以下のサプライヤーのいずれか <ul style="list-style-type: none"> • Advanced Analytical、カタログ番号：DNF-474 • Agilent、カタログ番号：5067-1504 • Agilent、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の消耗品

消耗品	サプライヤー
96-well 0.8 mL Polypropylene Deep well Storage (MIDI プレート)	Thermo Fisher Scientific、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 ウェル PCR プレート	Bio-Rad、部品番号：HSP-9601
Microseal 'B' シーリングフィルム	Bio-Rad、部品番号：MSB-1001
Microseal 'F' シーリングホイル	Bio-Rad、部品番号：MSF-1001

チューブワークフロー用の消耗品

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
1.7 mL マイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー

血液および唾液のインプット用の消耗品

消耗品	サプライヤー
Illumina Purification Beads	イルミナ、1 x 100 mL、カタログ番号：20060057 イルミナ、4 x 100 mL、カタログ番号：20060058
【血液】 Flex Lysis Reagent Kit	イルミナ、カタログ番号：20015884
【血液】 EDTA Blood Collection tubes	さまざまなサプライヤー
【唾液】 Oragene DNA Collection Kit for Saliva	Genotek、カタログ番号：OGR-500 または OGD-510

機器

プロトコールを開始する前に必要な機器が揃っていることを確認してください。

一部の消耗品や機器は特定のワークフローにのみ必要です。それらの消耗品および機器は別の表に記載されています。本プロトコールは、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。

機器	サプライヤー
微量遠心機	General lab supplier
Microheating System-Hybex System for Illumina	SciGene、カタログ番号 • 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	Thermo Fisher Scientific、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
以下の分析器のいずれか Advanced Analytical： • Fragment Analyzer™ Agilent Technologies： • 2100 Bioanalyzer Desktop System	Advanced Analytical、カタログ番号についてはウェブの製品ページを参照。 Agilent Technologies： • 部品番号：G2940CA
【唾液】 温度 50°C に到達する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
【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ます。	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の機器

機器	サプライヤー
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands (12 ポジション、1.5 mL)	Promega、カタログ番号：Z5342

プレートワークフロー用の機器

機器	サプライヤー
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：AM10027
高速マイクロプレートシェイカー	BioShake iQ High-Speed Thermal Mixer <ul style="list-style-type: none"> • Q Instruments、モデル番号：1808-0506 • Q Instruments、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。リストにないサーマルサイクラーがラボにある場合は、プロトコールを実行する前にサーマルサイクラーを検証してください。

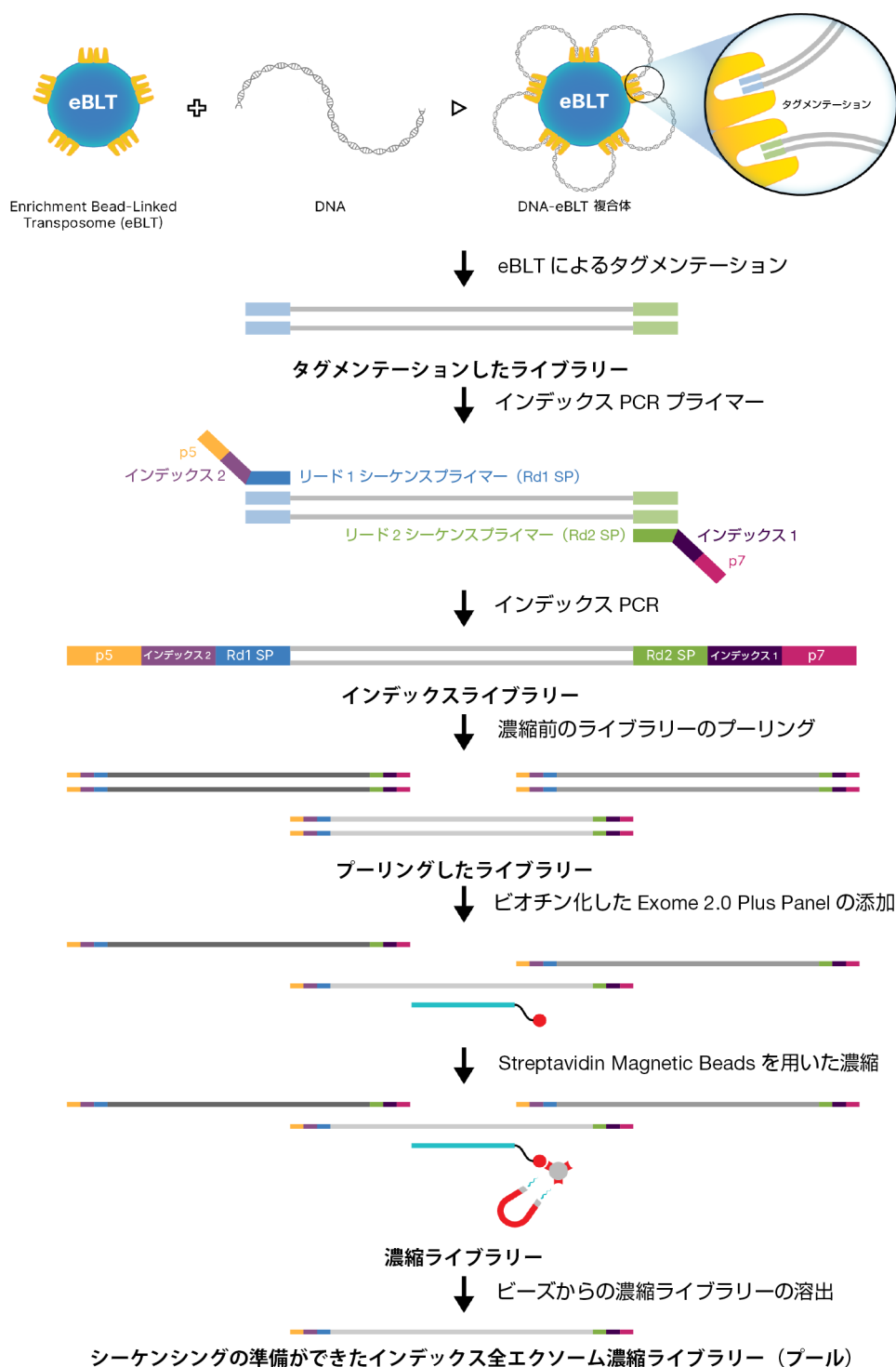
サーマルサイクラー	温度モード	リッド温度	容器タイプ
Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module (部品番号：1851197)	算出	加熱	プレート
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2 (部品番号：PTC-0240G)	算出	加熱、100℃に維持	ポリプロピレン製プレートおよびチューブ

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment アッセイの仕組み

Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment ワークフローは、ビーズベースのトランスポソーム複合体を用いてゲノム DNA をタグメンテーションします。これは 1 つのステップで 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。インプット DNA で飽和した後、ビーズベースのトランスポソーム複合体は一定数の DNA 分子を断片化します。このような断片化によって、幅広い DNA インプット範囲で、厳密な断片サイズ分布に一貫性のあるノーマライズされた濃縮前のライブラリーを作製する柔軟性が得られます。タグメンテーション後に、規定されたサイクル数の PCR によって DNA 断片の末端にアダプター配列を付加します。このステップで、イルミナの全シーケンスシステムにわたる互換性が実現します。さらに続いて、ターゲット濃縮ワークフローが行われます。プーリング後、二本鎖 DNA ライブラリーは変性され、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブは、変性したライブラリー断片にハイブリダイズされます。ハイブリダイゼーション後、Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) により、相補的エクソームにハイブリダイズされたビオチン化エクソームパネルプローブを含む複合体がキャプチャーされます。エクソーム濃縮およびインデックスライブラリーは、ビーズから溶出され、さらにシーケンスの前に増幅されます。

その後の Illumina Purification Beads (IPB) の精製ステップで、イルミナのシーケンスシステムで使用するためにライブラリーを精製します。

図 6 Illumina DNA Prep with Exome 2.0 Plus Enrichment のワークフロー



単一IPBの手法

単一 IPB の手法では、増幅された濃縮前のライブラリーを精製するためにビーズ精製手順を使用します。これは、標準的なダブルサイズセレクションの IPB の代用になるものです（16 ページの「ライブラリーの精製」）。

- 単一 IPB 精製では、ハイブリダイゼーションステップの前にライブラリーを濃縮する必要がなく、約 20 分間時間を節約できる可能性があります。
- この手法では、より適切な多様性が得られ、重複する断片の数を減らすことができます。ただし、断片サイズが幅広い場合、オンターゲットリードの割合が大きくなる場合があります。
- ダブルサイズセレクション IPB の精製とサイズ選択により、より均一な断片サイズとオンターゲットメトリクスが実現します。

消耗品

- IPB (Illumina Purification Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 用時調製した 80% エタノール (80% EtOH)
- 96-well 0.8 mL Polypropylene Deep-well Storage Plate (MIDI プレート) (2)
- 96 ウェル PCR プレート
- 1.7 mL マイクロチューブ
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- Microseal 'F' シーリングホイール
- ヌクレアーゼフリー水

試薬について

- IPB
 - 使用前に室温にする必要があります。
 - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
 - 頻繁にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
 - 粘性が高い液体ですので、ゆっくりと吸引し分注してください。

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	15°C ~ 30°C	室温で 30 分間静置します。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. サンプルごとに、無水エタノールから400 μL の80% EtOHを用時調製します。20%多めに調製することを推奨します。
3. ライブラリー調製の前にgDNAサンプルを精製する場合、ステップ4から開始して、gDNAサンプルに、その1.8倍の量のIPBを添加します。例えば、gDNAサンプルの液量が50 μL の場合、90 μL のIPBを添加します。その後、ステップ6 (IPBとサンプルの混合) に進み、残りの手順を続行します。

手順

1. 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45 μL を新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
4. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
5. 上清の入った各MIDIプレートウェルにIPBを81 μL ずつ添加します。
6. 各ウェルでピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1800 rpmで1分間攪拌します。
7. シールした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、すべての上清を除去して廃棄します。
10. 次の手順で2回洗浄します。
 - a. プレートを磁気スタンドに載せたまま、用時調製した80% EtOHを混合せずに200 μL 添加します。
 - 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、上清を除去して廃棄します。
11. 20 μL ピペットで、残存するEtOHを除去して廃棄します。
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. 17 μL のRSBをビーズに添加します。
15. プレートをシールし、プレートシェーカーを使用して1800 rpmで2分間攪拌します。
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. 上清15 μL を新しい96ウェルPCRプレートに移します。
19. プレートをシールします。

セーフストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、-25°C～-15°Cで保管します（最長 30 日間）。

略語

略語	定義
BLB	Blood Lysis Buffer
BLT	Bead-Linked Transposome
eBLT	Enrichment Bead-Linked Transposome
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
IPB	Illumina Purification Beads
NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
PK1	Proteinase K
PPC	PCR Primer Cocktail
RSB	Resuspension Buffer
SMB3	Streptavidin Magnetic Beads
ST2	Stop Tagment Buffer 2
TB1	Tagmentation Buffer 1
TWB	Tagment Wash Buffer
UD	ユニークデュアル

テクニカルサポート

技術的なサポートについては、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：jp.illumina.com

電子メール：techsupport@illumina.com

イルミナテクニカルサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	国際
アイルランド	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
イタリア	+39 800 985513	+39 236003759
インド	+91 8006500375	
インドネシア		0078036510048
英国	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
オーストラリア	+61 1800 775 688	
オーストリア	+43 800 006249	+43 1 9286540
オランダ	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
カナダ	+1 800 809 4566	
韓国	+82 80 234 5300	
シンガポール	1 800 5792 745	
スイス	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
スウェーデン	+46 2 00883979	+46 8 50619671
スペイン	+34 800 300 143	+34 911 899 417
タイ	+66 1800 011 304	
台湾 (中国)	+886 8 06651752	
中国		+86 400 066 5835
デンマーク	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
ドイツ	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
日本	+81 0800 111 5011	
ニュージーランド	+64 800 451 650	
ノルウェー	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
フィリピン	+63 180016510798	
フィンランド	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110

地域	フリーダイヤル	国際
フランス	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
米国	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
ベトナム	+84 1206 5263	
ベルギー	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
香港 (中国)	+852 800 960 230	
マレーシア	+60 1800 80 6789	

安全データシート (SDS) : イルミナのウェブサイト jp.support.illumina.com/sds.html から入手できます。

製品関連文書 : jp.support.illumina.com からダウンロードできます。



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
jp.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。
© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®