

Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation

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。

目次

第1章 概要	1
はじめに.....	1
RNA インプット量に関する推奨事項.....	1
追加リソース.....	1
第2章 プロトコール	3
はじめに.....	3
ヒントおよびテクニック.....	4
ライブラリー調製および濃縮のフロー図.....	5
RNA の変性.....	6
第1鎖 cDNA の合成.....	6
第2鎖 cDNA の合成.....	8
cDNA のタグメンテーション.....	9
ライブラリーの精製.....	12
ライブラリーのノーマライゼーション.....	14
プローブのハイブリダイゼーション.....	14
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー.....	16
濃縮ライブラリーの増幅.....	18
濃縮ライブラリーの精製.....	20
濃縮ライブラリーのチェック.....	21
ライブラリーの開始濃度への希釈.....	21
付録 A サポート情報	22
略語.....	22
キットの内容と保管条件.....	23
消耗品および機器.....	26
テクニカルサポート	27

第1章 概要

はじめに	1
RNA インプット量に関する推奨事項	1
追加リソース	1

はじめに

Illumina® RNA Prep, Tagmentation (L) with Enrichment キットは、インデックスキットおよび濃縮パネルを併用して、デュアルインデックスペアエンドシーケンスのための濃縮ライブラリーを作製します。逆転写により RNA を相補的 DNA (cDNA) に変換し、変換後の cDNA をタグメンテーションかつ増幅して、インデックスおよびその他のアダプターを付加します。こうして出来上がったライブラリーをノーマライズして 1-plex 濃縮または 3-plex 濃縮し、さらに増幅します。

配列特異的なビオチン化プローブで磁気ビーズと結合させ、対象領域をキャプチャーします。キャプチャーした配列を洗浄、溶出、増幅し、濃縮ライブラリーのコピーを作製します。限定サイクル PCR プログラムで濃縮断片を指数関数的に増幅し、個々の断片をコピーしてライブラリーの量を増やします。

本キットには次のような特徴があります。

- ▶ インプット量 10 ~ 100 ng のトータル RNA から得る高品質なシーケンスデータ
- ▶ より大きなインサートを作製する Tagmentation with Enrichment Bead-Linked Transposomes (EBLTL)
- ▶ IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes を用いたユニークデュアル (UD) インデックスの付加

RNA インプット量に関する推奨事項

本製品のプロトコールは、インプット量 10 ~ 100 ng の精製トータル RNA、あるいは分解したサンプルや FFPE (DV200 \geq 36.5) サンプル由来の 20 ~ 100 ng の RNA 向けに最適化されています。これよりもインプット量が少なかったり品質が低かったりすると、ライブラリー収量が減少する可能性があります。

RNA 抽出法には DNase 処理も含めてください。DNase 処理により、サンプル純度と定量の精度を確かなものにします。本プロトコールを開始する前に、標準的な手法を用いてトータル RNA を定量化し、断片解析法により質を調べます。

追加リソース

以下のリソースには、Illumina RNA Prep with Enrichment でのライブラリー調製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 RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation 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
プロトコールのカスタマイズ	ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、および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ます。
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation 『Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation Checklist』 (文書番号：1000000124436)	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 RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation 『Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation Consumables & Equipment』 (文書番号：1000000124437)	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)	バランスの取れたインデックスコンビネーションを使用して、イルミナのシステムでシーケンスするためのデュアルインデックスライブラリーを調製するためのガイドラインです。
『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。

第2章 プロトコール

はじめに	3
ヒントおよびテクニック	4
ライブラリー調製および濃縮のフロー図	5
RNAの変性	6
第1鎖 cDNA の合成	6
第2鎖 cDNA の合成	8
cDNA のタグメンテーション	9
ライブラリーの精製	12
ライブラリーのノーマライゼーション	14
プローブのハイブリダイゼーション	14
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー	16
濃縮ライブラリーの増幅	18
濃縮ライブラリーの精製	20
濃縮ライブラリーのチェック	21
ライブラリーの開始濃度への希釈	21

はじめに

本章では、ライブラリーを調製、濃縮する、Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation プロトコールの各ステップについて説明します。

- ▶ サンプルから解析に至る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。
- ▶ キットの中身を確認し、ライブラリー調製用試薬、ライブラリー濃縮用試薬、濃縮パネル、インデックスアダプターなど、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。全項目のリストは、22 ページの「サポート情報」を参照してください。

プーリングの準備

ライブラリーをプーリングする場合は、ライブラリー調製を開始する前にサンプルの情報を記録してください。お手持ちのシーケンスシステムおよびライブラリーと互換性のある記録ツールを使用してください。互換性については、Illumina RNA Prep with Enrichment のサポートページか、ご使用になるシステムのサポートページをご覧ください。

本プロトコールでは、IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes を使用して、ライブラリーをインデックス化します。これらのインデックスプライマーにより、インデックス 1 (i7) の配列とインデックス 2 (i5) の配列が、断片の各末端に付加されます。インデックス配列の長さはいずれも 10 bp です。

- ▶ プレックス数の少ない、カラーバランスの取れたプールを作成する方法については、『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: 11000000002694) を参照してください。

ビーズの取扱い

本プロトコールでは、AMPure XP、EBLTL、SMB という、3 種類のビーズを使用します。これらのビーズには、それぞれ特有の技術が応用されています。他のもので代用しないでください。

ビーズを取り扱う際は、以下の方法で行ってください。

- ▶ ビーズはすべて室温で使用してください。

- ▶ 2℃未満で保管されていた AMPure XP または SMB は、絶対に使用しないでください。
- ▶ ビーズを吸引したり分注したりする際は、粘性がありますので、ゆっくり行ってください。
- ▶ ビーズは、プロトコール全体にわたって頻繁にボルテックスし、懸濁してください。懸濁後のビーズは、均等に分布しており、色が均一になっています。
- ▶ ウェル側面のビーズにも液体がかかるように液体を分注してください。
- ▶ 液体はビーズペレットに直接分注してください。
- ▶ 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たり、ビーズペレットを動かしたりしないでください。
- ▶ 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。
- ▶ ビーズがウェルの側面に付着した場合は、280 × g で3秒間遠心分離し、その後、分注して懸濁します。

ヒントおよびテクニック

プロトコールを途中で中断しない

- ▶ 指定の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。
- ▶ RNA が二本鎖 cDNA に変換されるまでは、操作を長時間中断しないでください。
- ▶ 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。
- ▶ アダプターまたはプライマーを添加する場合は、**ウェ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プレートは作業台から取り除いてください。

試薬および RNA の取り扱い

- ▶ インプットする RNA を複数回凍結／融解しないでください。
 - ▶ RNA は、RNase フリー水または TE バッファーに入れた状態で、- 85℃～- 65℃で最長1年間保存可能です。
 - ▶ このサンプルを使用する場合は、チューブにアリコートし、単回使用してください。
- ▶ 融解した試薬は必要時まで氷上に置いておいてください。試薬はすべて、使用后、保管場所に正しく戻してください。
- ▶ プレートは、未使用時にはシールして蓋をし、コンタミネーションを最小限に抑えてください。

プレートのシール

- ▶ プロトコール全体にわたって、Microseal 「B」 粘着シールを使用してください。このシールは- 40℃～110℃で効果を発揮します。
- ▶ このシールでプレートを覆い、ゴム製ローラーまたはゴム製ウェッジで密閉してください。
- ▶ プレートから取り外したシールは、使用后毎回廃棄してください。

プレート間の移動

- ▶ 溶液をプレートから別のプレートに移す場合は、プレートの各ウェルから特定の分量を取り、別のプレートの対応するウェルに移してください。

遠心分離

- ▶ 各ステップにおいて、280 × g で 10 秒間遠心分離を行うことで、ウェルの底に溜まっている液体やビーズを均一にしてサンプルロスを防ぎます。

ライブラリー調製および濃縮のフロー図

下の図に、Illumina RNA Prep + Enrichment のプロトコルの概要を示します。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。



RNAの変性

このステップでは、トータル RNA を変性させ、ランダムヘキサマーをアニールします。ランダムヘキサマーでサンプルを刺激して cDNA 合成を促します。

消耗品

- ▶ EPH3 (Elute、Prime、Fragment High Concentration Mix)
- ▶ ヌクレアーゼフリー超純水
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカード付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ FSA (First Strand Synthesis Act D Mix)

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EPH3	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。
FSA	- 25°C ~ - 15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。

- 2 以下の DEN_RNA 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 17 μ L に設定します。
 - ▶ 65°C で 5 分間
 - ▶ 4°C で保持します。

手順

- 1 新しい PCR プレートの各ウェル内で、10 ~ 100 ng のトータル RNA をヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、8.5 μ L になるようにします。
- 2 各ウェルに EPH3 を 8.5 μ L ずつ添加します。
- 3 ピペティングを 10 回行って混合し、その後に密閉します。
- 4 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
- 5 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、DEN_RNA プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 5 分間程です。
- 6 280 \times g で 10 秒間遠心分離します。
- 7 直ちに第 1 鎖 cDNA の合成に進みます。各ウェルは、ランダムヘキサマーに結合した変性 RNA 17 μ L を含有します。

第 1 鎖 cDNA の合成

このステップでは、ヘキサマーで刺激した RNA 断片を逆転写し、第 1 鎖相補的 DNA (cDNA) を生成します。

消耗品

- ▶ FSA (First Strand Synthesis Act D Mix)
- ▶ RVT (Reverse Transcriptase)
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ Agencourt AMPure XP
 - ▶ RSB (Resuspension Buffer) (凍結)
 - ▶ SMM (Second Strand Marking Master Mix)



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。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	2°C ~ 8°C	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB*	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RVT	- 25°C ~ - 15°C	必要時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心分離します。
SMM	- 25°C ~ - 15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。

* 本プロトコル中の RSB はさまざまな温度で保管されています。所定の温度で保管してください。

- 2 以下の FSS 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 25 μ L に設定します。
 - ▶ 25°C で 10 分間
 - ▶ 42°C で 15 分間
 - ▶ 70°C で 15 分間
 - ▶ 4°C で保持します。

手順

- 1 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、First Strand Synthesis Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
 - ▶ FSA (9 μ L)
 - ▶ RVT (1 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 First Strand Synthesis Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
- 3 各ウェルに First Strand Synthesis Master Mix を 8 μ L ずつ添加します。

- 4 ピペッティングを 10 回行い、その後に密閉します。
- 5 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 6 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、FSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 43 分程で、各ウェルの含有量は 25 μL です。

第 2 鎖 cDNA の合成

このプロセスでは、RNA テンプレートを除去し、代替鎖を合成して、末端が平滑化された二本鎖 cDNA 断片を生成します。その後、磁気ビーズにより、cDNA を Second Strand Synthesis Master Mix から分離します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SMM (Second Strand Marking Master Mix)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカーフ付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

事前準備

- 1 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。
- 2 以下の SSS 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、40°C に設定します。
 - ▶ 反応量を 50 μL に設定します。
 - ▶ 16°C で 1 時間
 - ▶ 4°C で保持します。

手順

cDNA の生成

- 1 密閉した PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 SMM を転倒混和し、短時間遠心分離します。
- 3 各ウェルに SMM を 25 μL ずつ添加します。
- 4 ピペッティングを 10 回行い、その後に密閉します。
- 5 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 6 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、SSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 1 時間程で、各ウェルの含有量は 50 μL です。

cDNA の精製

- 1 密閉した PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに AMPure XP を 90 μL ずつ添加します。
- 4 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。

- 5 室温で5分間インキュベートします。
- 6 280 × g で10秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 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 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 ビーズを以下のとおり洗浄します。
 - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製80% EtOHを175 μLずつ添加します。
 - b 30秒間待ちます。
 - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 10 **2回目**の洗浄をします。
- 11 10 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 12 磁気スタンド上で2分間風乾します。ビーズを乾燥しすぎないように注意してください。
- 13 磁気スタンドから外します。
- 14 各ウェルにRSBを19.5 μLずつ添加します。
- 15 密閉し、2700 rpm で1分間攪拌します。
- 16 室温で2分間インキュベートします。
- 17 280 × g で10秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 18 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約4分間）待ちます。
- 19 各ウェルから、上清を17.5 μLずつ、新しいPCRプレートに移します。
少量のビーズが残っていても性能には影響ありません。

セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、-25℃~-15℃で保存してください（最長7日間）。

cDNA のタグメンテーション

このステップでは、Enrichment Bead-Linked Transposomes を使用して、二本鎖 cDNA のタグメンテーションをします。このタグメンテーションプロセスにより、cDNA を断片化し、アダプター配列を付加します。

タグメンテーション後、これらの断片を精製、増幅し、インデックスアダプター配列を付加してデュアルインデックスを作製し、P7配列とP5配列を付加してクラスターを作製します。インデックスアダプターの選択については、3ページの「[プーリングの準備](#)」を参照してください。

消耗品

- ▶ EBLTL (Enrichment Bead-Linked Transposomes)
- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ インデックスアダプタープレート (UDPOXXX)
- ▶ ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- ▶ TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- ▶ TWB (Tagmentation Wash Buffer)
- ▶ ヌクレアーゼフリー超純水
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

試薬について

- ▶ インデックスアダプタープレートの各ウェルは単回使用で、UDPOXXX (10 µL 超) を含有します。UDPOXXX は、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターとインデックス 2 (i5) アダプターです。
- ▶ 行および列のラベルはインデックスアダプタープレートの底面に印刷されています。プレートを持ち上げてラベルを確認してください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EBLTL	2°C ~ 8°C	室温に戻し、30 秒間ボルテックスして混合します。ビーズがチューブの底に残っている場合は、ビーズが懸濁されるまでボルテックスします。
EPM	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。
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。ボルテックスして混合し、1000 × g で 1 分間遠心分離します。
ST2	室温	ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。
TB1	-25°C ~ -15°C	室温に戻し、ボルテックスして混合します。
TWB	室温	ボルテックスして混合します。

- 2 ST2 チューブに沈殿物が見られる場合は、
 - a 37°C で 10 分間加熱します。
 - b 沈殿物が溶解するまでボルテックスします。
 - c 室温に戻します。
- 3 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 µL に設定します。
 - ▶ 55°C で 5 分間
 - ▶ 10°C で保持
- 4 以下の TAG_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 µL 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

インプット量	サイクル数 (X) ¹
高品質 RNA (DV200 値が 80% 超)	14
FFPE および DV200 値が 80% 未満の RNA	17
[Respiratory Virus Panel] 抽出したウイルス RNA	17

¹ 目的に見合ったライブラリー収量および特異性を実現するには、ご使用になるサンプルのタイプとインプット量に合わせて PCR サイクル数を最適化してください。

手順

EBLTL 法によるタグメンテーション

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、Tagmentation Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
 - ▶ TB1 (11.5 μL)
 - ▶ EBLTL (11.5 μL)
 - ▶ ヌクレアーゼフリー超純水 (14.5 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。
- 3 Tagmentation Master Mix をしっかりボルテックスして懸濁させます。
- 4 各ウェルに Tagmentation Master Mix を 32.5 μL ずつ添加します。
- 5 しっかりピペティングし、その後に密閉します。
- 6 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。プログラムの所要時間は計 5 分程で、各ウェルの含有量は 50 μL です。

タグメンテーションした cDNA の洗浄

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 室温で 2 分間インキュベートします。
- 3 各ウェルに ST2 を 10 μL ずつ添加します。
- 4 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
- 5 室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 280 × g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 7 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。
- 8 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 ビーズを以下のとおり洗浄します。
 - a 磁気スタンドから外します。
 - b 各ウェルに TWB を 100 μL ずつ添加します。
 - c 密閉し、2000 rpm で 1 分間攪拌します。
 - d 280 × g で 3 秒間遠心分離します。
 - e 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。
 - f 上清をすべて除去し、廃棄します。

- 10 **2回目**のビーズ洗浄をします。
- 11 **3回目**のビーズ洗浄をします。**ステップ f は省略します。**
乾燥しすぎないようにするため、ウェルには TWB が残存しています。
- 12 磁気スタンドに載せたまま、直ちに**タグメンテーションした DNA の増幅**に進みます。
各ウェルは、ビーズおよびタグメンテーションした cDNA 100 μ L を含有します。

タグメンテーションした DNA の増幅

- 1 以下の分量を正確に混合し、PCR Master Mix を調製します。それぞれの分量に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超純水 (23 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 PCR Master Mix をしっかりボルテックスして混合します。
- 3 プレートに磁気スタンドに載せたまま、TWB の上清をすべて除去し、廃棄します。
- 4 20 μ L ピペットで、残存 TWB をすべて除去します。気泡は特に問題なく、ライブラリーに影響を及ぼすことはありません。
- 5 磁気スタンドから外します。
- 6 各ウェルに PCR Master Mix を 40 μ L ずつ添加します。
- 7 ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、今回使用するインデックスアダプタープレートのウェルを覆っているホイルに穴を開けます。
- 8 各ウェルに UDP0XXX を 10 μ L ずつ添加します。これらの分量をインデックスアダプタープレートから PCR プレートに移します。
- 9 密閉し、2000 rpm で 1 分間攪拌します。
- 10 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
- 11 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_PCR プログラムを実行します。
プログラムの所要時間は計 50 ~ 60 分間程で、各ウェルは DNA が結合したビーズ 50 μ L を含有します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、 -25°C ~ -15°C で保存してください (最長 7 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)。

ライブラリーの精製

このステップでは、タグメンテーションしたライブラリーを磁気ビーズで精製します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer) (冷蔵)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	2℃～8℃	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB*	2℃～8℃	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

* 本プロトコール中の RSB はさまざまな温度で保管されています。所定の温度で保管してください。

- 2 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 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。
- 3 各ウェルから、上清を 45 μL ずつ、新しい PCR プレートに移します。
- 4 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 5 各ウェルに AMPure XP を 81 μL ずつ添加します。
- 6 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
- 7 室温で 5 分間インキュベートします。
- 8 280 × g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 9 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。
- 10 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 11 ビーズを以下の手順で洗浄します。
 - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL ずつ添加します。
 - b 30 秒間待ちます。
 - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 12 **2 回目**のビーズ洗浄をします。
- 13 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 14 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズを乾燥しすぎないように注意してください。
- 15 磁気スタンドから外します。
- 16 各ウェルに RSB を 17 μL ずつ添加します。
- 17 密閉し、2700 rpm で 1 分間攪拌します。
- 18 室温で 2 分間インキュベートします。
- 19 280 × g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 20 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。
- 21 各ウェルから、上清を 15 μL ずつ、新しい PCR プレートに移します。

セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、- 25℃～- 15℃で保存してください（最長 30 日間）。

ライブラリーのノーマライゼーション

このステップでは、ライブラリーを定量化し、ノーマライズしたうえで、結合させて1個のプールにし、1-plex 濃縮または3-plex 濃縮します。結果は、ライブラリー当たり 200 ng 向けに最適化されます。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer) (冷蔵)
- ▶ Qubit dsDNA BR Assay Kit
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカード付き)
- ▶ **[オプション]** Agilent DNA 1000 Kit

事前準備

- 1 セーフティストップポイントでの中断後にプロトコルを再開する場合は、以下の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
RSB*	2°C ~ 8°C	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

* 本プロトコル中の RSB はさまざまな温度で保管されています。所定の温度で保管してください。

手順

- 1 Qubit dsDNA BR Assay Kit でライブラリー 1 μ L の解析をします。予測収量は約 200 ng です。
- 2 **[オプション]** Agilent 2100 Bioanalyzer System および DNA 1000 Kit でライブラリー 1 μ L の解析をします。
- 3 **[呼吸器系ウイルスパネルライブラリー]** 希釈していないライブラリー 7.5 μ L を、新しい PCR プレートの 1 個のウェルに移します。
- 4 **[その他のライブラリー]** ライブラリーを、次のとおり、RSB で希釈します。
 - ▶ 1-Plex 濃縮の場合、1 個の 200 ng ライブラリーを希釈して 7.5 μ L にします。
 - ▶ 3-plex 濃縮の場合、3 個の 200 ng ライブラリーを希釈して、それぞれ 2.5 μ L にします。
- 5 **[その他のライブラリー]** 新しい PCR プレートの 1 個のウェル内で、該当する数の 200 ng ライブラリーを混合します。

200 ng ライブラリー数 (濃縮プレキシティ)	総重量 (ng)	総容量 (μ L)
1	200	7.5
3	600	7.5

- ▶ 総容量が 7.5 μ L を超える場合は、減圧濃縮器または Amicon Ultra-0.5 遠心式フィルターユニット (0.5 mL、30 kDa) を使用して、プールしたサンプルを 7.5 μ L に濃縮してください。
- ▶ 減圧濃縮器を使用する場合は、加熱なしで、乾燥速度を「中」に設定してください。
- ▶ Amicon Ultra-0.5 遠心式フィルターユニット (0.5 mL、30 kDa) を使用する場合は、使用前に洗浄する必要はありません。5 分間で大部分が濾過されます。開始容量が多いと、濾過に最長 30 分間かかる場合があります。

プローブのハイブリダイゼーション

このステップでは、対象領域を標的にするため、ライブラリープールにキャプチャープローブを付加します。本操作には、濃縮試薬と、濃縮パネルのオリゴを使用します。

消耗品

- ▶ EHB2 (Enrich Hyb Buffer 2)
- ▶ NHB2 (Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers)
- ▶ 濃縮用オリゴ
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

試薬について

- ▶ NHB2 は保管中に沈殿することがあります。

事前準備

- 1 マイクロヒーティングシステムを 50°C に予熱します。
- 2 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EHB2	2°C ~ 8°C	室温に戻し、ボルテックスして混合します。
濃縮用オリゴ	-25°C ~ -15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
NHB2	-25°C ~ -15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。 予熱したマイクロヒーティングシステムに入れ、5 分間インキュベートします。

- 3 予熱した NHB2 を次のとおり混合します。
 - a 10 秒間のボルテックスを 3 回繰り返します。
 - b ピペティングで完全に懸濁させます。再沈殿を防ぐため、使用時まで保温しておきます。
- 4 EHB2 または NHB2 が結晶化あるいは混濁した場合は、透明になるまでボルテックスあるいはピペティングします。
- 5 以下の 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 25 µL に設定します。
 - ▶ 95°C で 5 分間
 - ▶ 1 分間を 18 サイクル：
 - ▶ 初回サイクルは 94°C
 - ▶ その後はサイクルごとに 2°C ずつ下げます。
 - ▶ 58°C で 90 分間
 - ▶ 58°C で最長 24 時間保持します。

58°C でのハイブリダイゼーションの所要時間は最低 90 分です。一晩ハイブリダイゼーションする場合は、保持時間を最長 24 時間延長できます。保持時間を延長しない場合、プログラムの所要時間は計 2 時間程です。

手順

- 1 新しい PCR プレートの各ウェルに、以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - ▶ 200 ng ライブラリーまたは 600 ng プール (7.5 µL)
 - ▶ NHB2 (12.5 µL)

- ▶ 濃縮用オリゴ (2.5 μ L)
 - ▶ EHB2 (2.5 μ L)
- 2 ピペッティングを 10 回行って混合し、その後に密閉します。
 - 3 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。EHB2 により反応液が混濁する場合がありますが、これは正常です。
 - 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、HYB プログラムを実行します。
 - 5 58°C で 90 分間～ 24 時間インキュベートします。各ウェルの含有量は 25 μ L です。

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、磁気ビーズを用いて、対象となる標的ライブラリー断片にハイブリダイズしたプローブをキャプチャーします。加熱洗浄により、ビーズから非特異的な結合を除去することができます。その後、濃縮ライブラリーがビーズから溶出します。

消耗品

- ▶ EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ▶ EEW (Enhanced Enrichment Wash)
- ▶ ET2 (Elute Target Buffer 2)
- ▶ HP3 (2 N NaOH)
- ▶ SMB (Streptavidin Magnetic Beads)
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカーコート付き) (2)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

事前準備

- 1 マイクロヒーティングシステムを 58°C に予熱します。
- 2 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EE1	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
EEW	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
ET2	2°C ~ 8°C	室温に戻し、ボルテックスして混合します。
HP3	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
SMB	2°C ~ 8°C	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

- 3 EEW を予熱したマイクロヒーティングシステムに入れます。保温します。
- 4 以下の分量を正確に混合し、Elution Master Mix を調製します。それぞれの分量に合計サンプル数を乗じてください。
 - ▶ EE1 (28.5 μ L)
 - ▶ HP3 (1.5 μ L)
 気泡が生じても正確にピペッ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 Elution Master Mix をしっかりピペッティングして混合し、室温に置いておきます。
- 6 サーマルサイクラーを次のとおり設定します。
 - ▶ インキュベーションのオプションがある場合は、インキュベーションを 58°C に設定してください。

- ▶ インキュベーションのオプションがない場合は、以下の Incubation プログラムを保存します。
- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、70°Cに設定します。
- ▶ 反応量を 100 μ L に設定します。
- ▶ 58°Cで保持します。

手順

キャプチャー

- 1 密閉した PCR プレート を 280 \times g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 SMB をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに SMB を 62.5 μ L ずつ添加します。
- 4 ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後に密閉します。
- 5 58°Cのサーマルサイクラーに入れ、15 分間インキュベートします。
プログラムを続行します。サーマルサイクラーは、キャプチャーと 4 回の洗浄の間、継続的に作動します。
- 6 15 分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a 280 \times g で 10 秒間遠心分離します。
 - b 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 上清をすべて除去し、廃棄します。

1 回目の洗浄

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルに予熱した EEW を 50 μ L ずつ添加します。
- 3 密閉し、2400 rpm で 4 分間攪拌します。
- 4 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。
- 5 プレートを 58°Cのサーマルサイクラーに戻し、5 分間インキュベートします。
- 6 5 分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
 - b 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 上清をすべて除去し、廃棄します。

2 回目および 3 回目の洗浄

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルに予熱した EEW を 50 μ L ずつ添加します。
- 3 密閉し、2000 rpm で 1 分間攪拌します。
- 4 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。
- 5 プレートを 58°Cのサーマルサイクラーに戻し、5 分間インキュベートします。
- 6 5 分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
 - b 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。プログラムを続行します。

- 7 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 8 3回目の洗浄で、ステップ1～7を繰り返します。

移動洗浄

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルに予熱した EEW を 50 μ L ずつ添加します。
- 3 密閉し、2000 rpm で 1 分間攪拌します。
- 4 280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
- 5 各ウェルから、懸濁したビーズ溶液 50 μ L を新しい PCR プレートに移します。
このように新しい PCR プレートに移すことで、増幅の妨げとなり得る試薬の残存を最小限に抑えることができます。
- 6 密閉し、280 \times g で 3 秒間遠心分離します。
- 7 58°C のサーマルサイクラーに戻し、5 分間インキュベートします。
- 8 5 分間のインキュベーション後、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。
- 9 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 EEW をすべて除去し、廃棄します。
- 11 乾燥しすぎないようにするため、直ちに「溶出」に進みます。

溶出

- 1 Elution Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
- 2 プレートを磁気スタンドから外します。
- 3 各ウェルに Elution Master Mix を 23 μ L ずつ添加します。
- 4 密閉し、2600 rpm で 1 分間攪拌します。
- 5 室温で 2 分間インキュベートします。
- 6 280 \times g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 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 各ウェルから、上清を 21 μ L ずつ、新しい PCR プレートに移します。
- 9 各ウェルに ET2 を 4 μ L ずつ添加します。
- 10 密閉し、2000 rpm で 1 分間攪拌します。
各ウェルの含有量は 25 μ L です。

セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、 -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増幅

このステップでは、14 サイクル PCR プログラムを用いて、濃縮ライブラリーを増幅します。

消耗品

- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ PPC (PCR Primer Cocktail)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ RSB (Resuspension Buffer) (冷蔵)
 - ▶ Agencourt AMPure XP

事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	2°C～8°C	30分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
EPM	-25°C～-15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。
PPC	-25°C～-15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。
RSB*	2°C～8°C	30分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

*本プロトコル中のRSBはさまざまな温度で保管されています。所定の温度で保管してください。

- 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 µLに設定します。
 - ▶ 98°Cで30秒間
 - ▶ 以下を14サイクル：
 - ▶ 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

手順

- 1 密閉したプレートを手で280 × gで10秒間遠心分離します。
- 2 PCRプレートの各ウェルにPPCを5 µLずつ添加します。
- 3 各ウェルにEPMを20 µLずつ添加します。
- 4 密閉し、2000 rpmで1分間攪拌します。
- 5 280 × gで10秒間遠心分離します。
- 6 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。プログラムの所要時間は計35分程で、各ウェルの含有量は50 µLです。

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）。

濃縮ライブラリーの精製

このステップでは、磁気ビーズを用いて濃縮ライブラリーを精製します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカーフ付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

事前準備

- 1 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。

手順

- 1 密閉したプレートを 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに AMPure XP を 90 μL ずつ添加します。
- 4 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
- 5 室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 280 × g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 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 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 ビーズを以下のとおり洗浄します。
 - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL ずつ添加します。
 - b 30 秒間待ちます。
 - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 10 **2 回目**のビーズ洗浄をします。
- 11 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 12 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。
- 13 磁気スタンドから外します。
- 14 各ウェルに RSB を 32 μL ずつ添加します。
- 15 密閉し、2600 rpm で 1 分間攪拌します。
- 16 室温で 2 分間インキュベートします。
- 17 280 × g で 10 秒間遠心分離し、その後に密閉を解きます。
- 18 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 各ウェルから、上清を 30 μL ずつ、新しい PCR プレートに移します。

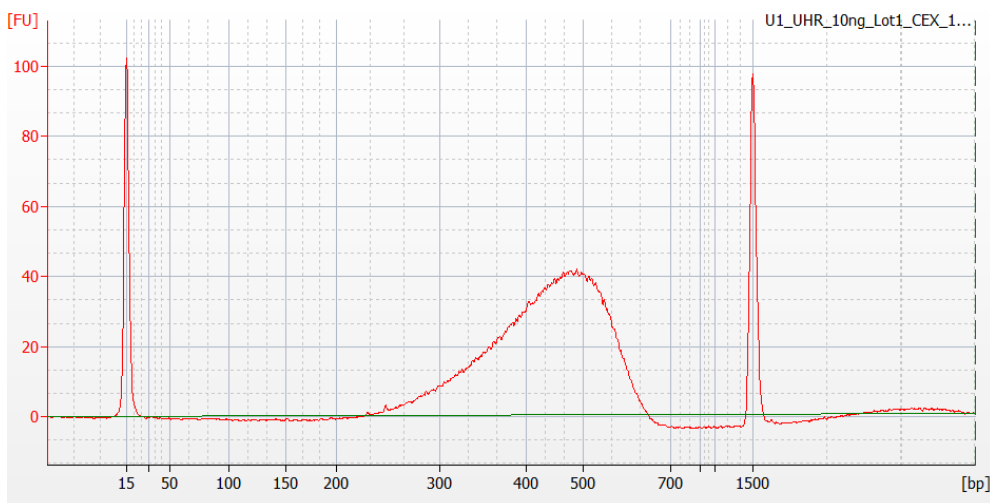
セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、- 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

- 以下の両方の方法を用いて、濃縮ライブラリーをチェックします。
 - ▶ Qubit dsDNA HS Assay キットで濃縮ライブラリー 1 μL を解析し、ライブラリーの濃度 (ng/ μl) を定量化します。
 - ▶ Agilent 2100 Bioanalyzer System および DNA 1000 キットで濃縮ライブラリー 1 μL を解析し、定量化します。

図 1 Bioanalyzer で求めた収量の見本



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、NovaSeq 6000 システム、NextSeq 550 システム、あるいは NextSeq 500 システムでの開始濃度に希釈します。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。シーケンスにはペアエンドランを推奨します。インデックスリード当たりのサイクル数は 10 です。リード当たりのサイクル数はシーケンスシステムによって異なります。

- 該当する手法を用いて、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 のみで定量化したライブラリーの場合は、そのライブラリーのモル濃度を使用します。
 - ▶ Bioanalyzer と Qubit で定量化したライブラリーの場合は、以下の式よりモル濃度を算出します。Bioanalyzer より求めた平均サイズと、Qubit より求めた濃度を使用します。

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

- 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)
NextSeq 550/NextSeq 500	20	0.8
NovaSeq 6000	0.6	120

- RSB を用いて、それぞれのライブラリーを、使用システムの開始濃度に希釈します。希釈後の 10 μL のライブラリーをチューブ内で結合し、ライブラリーをプールします。
- 使用システムの変性希釈手順に従って、ライブラリーを最終ローディング濃度に希釈します。

サポート情報

略語.....	22
キットの内容と保管条件.....	23
消耗品および機器.....	26

略語

略語	定義
CEX	Coding Exome Oligos
dsDNA	二本鎖 DNA
EBLTL	Enrichment Bead-Linked Transposomes
EE1	Enrichment Elution Buffer 1
EEW	Enhanced Enrichment Wash
EHB2	Enrich Hyb Buffer 2
EPH3	Elute、Prime、Fragment、High Concentration Mix
EPM	Enhanced PCR Mix
ET2	Elute Target Buffer 2
EtOH	エタノール
HP3	2 N NaOH
NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
PPC	PCR Primer Cocktail
RSB	Resuspension Buffer
RVO	Respiratory Virus Oligos
SMB	Streptavidin Magnetic Beads
SMM	Second Strand Marking Master Mix
ST2	Stop Tagment Buffer 2
TB1	Tagmentation Buffer 1
TWB	Tagment Wash Buffer
UD	ユニークデュアル

キットの内容と保管条件

ライブラリー調製を開始する前に、本セクションに記載されている試薬がすべて揃っていることを確認してください。本プロトコールには、Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation 一式、パネル 1 個、IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes が 1 セット以上必要です。4 セットすべて組み合わせると 384 のライブラリーのインデックス化が可能です。

項目	製品名	当社カタログ番号
ライブラリー調製	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Samples)	20040536
	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Samples)	20040537
インデックス	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
パネル	Illumina Exome Panel	20020183
	Respiratory Virus Panel	20042472

上記の調製キットには、16 サンプルサイズまたは 96 サンプルサイズ用の変性用試薬、cDNA 合成用試薬、ライブラリー調製用試薬、濃縮用試薬が含まれており、パネルにはアプリケーション特有のオリゴが含まれています。インデックスセットには、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターおよびインデックス 2 (i2) アダプターが含まれています。

これらのイルミナ製品には、Agencourt AMPure XP は含まれていません。サプライヤーについては、[補助消耗品](#)をご覧ください。

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Samples) (20040536)

Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EPH3	Elute, Prime, Fragment, High Concentration Mix	透明	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	FSA	First Strand Synthesis Act D Mix	琥珀色	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Beads

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EBLTL	Bead-Linked Transposomes	黄色	2°C ~ 8°C	2°C ~ 8°C
2	RSB	Resuspension Buffer	透明	2°C ~ 8°C	2°C ~ 8°C

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	ST2	Stop Tagment Buffer 2	赤色	2°C ~ 8°C	室温
1	TWB	Tagment Wash Buffer	透明	2°C ~ 8°C	室温

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation PCR Reagents

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
2	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	TB1	Tagmentation Buffer 1	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment Beads + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment PCR + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EE1	Enrichment Elution Buffer 1	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	EEW	Enhanced Enrichment Wash	琥珀色	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	HP3	2 N NaOH	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers	青	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	PPC	PCR Primer Cocktail	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Samples)
(20040537)

Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
4	EPH3	Elute, Prime, Fragment, High Concentration Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	FSA	First Strand Synthesis Act D Mix	琥珀色	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
2	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Beads

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
4	EBLTL	Bead-Linked Transposomes	黄色	2℃～8℃	2℃～8℃
2	RSB	Resuspension Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
4	ST2	Stop Tagment Buffer 2	赤色	2℃～8℃	室温
1	TWB	Tagment Wash Buffer	透明	2℃～8℃	室温

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation PCR Reagents

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
4	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
4	TB1	Tagmentation Buffer 1	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment Beads + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
2	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment PCR + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
2	EE1	Enrichment Elution Buffer 1	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
4	EEW	Enhanced Enrichment Wash	琥珀色	2℃～8℃	-25℃～-15℃
2	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	HP3	2 N NaOH	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers	青	2℃～8℃	-25℃～-15℃
1	PPC	PCR Primer Cocktail	透明	2℃～8℃	-25℃～-15℃

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes、-25℃～-15℃で保管
(96 indexes, 96 Samples) (20027213、20027214、20042666、
20042667)

数量	試薬	説明
1	UDP0001-UDP0096	Set A のインデックスアダプタープレート
1	UDP0097-UDP0192	Set B のインデックスアダプタープレート
1	UDP0193-UDP0288	Set C のインデックスアダプタープレート
1	UDP0289-UDP0384	Set D のインデックスアダプタープレート

Enrichment Panels (20020183、20042472)

パネル名	数量	試薬	説明	出荷時	保管条件
Illumina Exome Panel	1	CEX	Coding Exome Oligos	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
Respiratory Virus Panel	1	RVO	Respiratory Virus Oligos	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

消耗品および機器

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。

補助消耗品

消耗品	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
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
1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)	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
20 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 ピペットチップ	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
96 ウェル PCR プレート (セミスカーフ付き)	一般的なラボ用品サプライヤー
Agilent DNA 1000 Kit	アジレント、カタログ番号：5067-1504
Agencourt AMPure XP (5 mL)	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63880
無水エチルアルコール (500 mL)	シグマ アルドリッチ、カタログ番号：E7023
Microseal 「B」 Plate Sealing Film	バイオ・ラッド、カタログ番号：MSB1001
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
Qubit Assay Tubes	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 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：Q32850 または Q32853
ヌクレアーゼフリー超純水	一般的なラボ用品サプライヤー

補助機器

機器	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 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 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 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
2100 Bioanalyzer Desktop System	アジレントテクノロジー、カタログ番号：G2940CA
粘着シールローラー	一般的なラボ用品サプライヤー
Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler + 96-Deep Well Reaction Module	バイオラッド、カタログ番号：1851197
マイクロサンプルインキュベーター	一般的なラボ用品サプライヤー
マイクロサンプルインキュベーター用 1.5 mL チューブブロック	一般的なラボ用品サプライヤー
機器	サプライヤー
磁気スタンド -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
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー

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。

Website: www.illumina.com

Email: 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	800.960.230	
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®