

MiSeq System

Denature and Dilute Libraries Guide

| | |
|--|----|
| 概要 | 3 |
| 消耗品および機器 | 4 |
| プロトコル A：標準的なノーマライゼーション法 | 4 |
| プロトコル B：ビーズベースのノーマライゼーション法 | 6 |
| プロトコル C：AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法 | 7 |
| プロトコル D：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法 | 9 |
| PhiX コントロールの変性と希釈 | 10 |
| 補足情報 | 12 |
| 次の手順 | 12 |
| 改訂履歴 | 13 |
| テクニカルサポート | 14 |



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を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く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。

© 2019 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。

概要

このガイドでは、イルミナ® MiSeq™ システムでのシーケンス用に調製済みライブラリーを変性および希釈する手順について説明します。

また、シーケンスコントロールとして使用するために PhiX ライブラリーを調製する手順も含まれています。

ローディング量とローディング濃度

この手順では、ライブラリーを変性させて希釈し、最終的な量を 600 μ L にします。推奨ローディング濃度は、シーケンスランに使用する MiSeq Reagent Kit のバージョンによって異なります。実際には、ローディング濃度はライブラリー調製方法と定量方法によって異なる場合があります。

| ケミストリー | 推奨される最終ローディング濃度 |
|----------------------|---|
| MiSeq Reagent Kit v3 | 6 ~ 20 pM のローディング濃度をサポート。 変性と希釈の前に、少なくとも 4 nM ライブラリーが必要です。 |
| MiSeq Reagent Kit v2 | 6 ~ 10 pM のローディング濃度をサポート。 |

プロトコルの種類

ライブラリー調製の際に用いた手法に応じた、適切な変性および希釈プロトコルに従ってください。

- ▶ **標準的なノーマライゼーション**：ライブラリー調製の文書で推奨されている標準的なライブラリー定量と品質管理の手順を用いてノーマライズされたライブラリーの場合。これらのライブラリーについては、**プロトコル A** に従ってください。4 ページの「**プロトコル A：標準的なノーマライゼーション法**」を参照してください。
- ▶ **ビーズベースのノーマライゼーション**：ライブラリー調製の文書に記載されているビーズベースのノーマライゼーションをサポートする方法に示された、ビーズベースの手順を用いてノーマライズされたライブラリーの場合。これらのライブラリーについては、**プロトコル B** に従ってください。6 ページの「**プロトコル B：ビーズベースのノーマライゼーション法**」を参照してください。
- ▶ **AmpliSeq™ for Illumina のノーマライゼーション**：標準的な AmpliSeq for Illumina ワークフローを用いて調製されたすべてのライブラリーについては、**プロトコル C** に従ってください。7 ページの「**プロトコル C：AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法**」を参照してください。
- ▶ **AmpliSeq Library Equalizer™ for Illumina のノーマライゼーション**：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたすべてのライブラリーについては、**プロトコル D** に従ってください。9 ページの「**プロトコル D：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法**」を参照してください。

ベストプラクティス

- ▶ クラスター形成用のライブラリーを変性させる場合は、**必ず**新しく希釈した NaOH を調製してください。変性プロセスの過程において、この手順が不可欠です。
- ▶ 少ない液量のピペティングにより生じるエラーで最終 NaOH 濃度に影響を与えないよう、新しく希釈した NaOH を 1 mL 以上調製します。
- ▶ 最良の結果を得るため、ライブラリーの変性と希釈の前に、試薬カートリッジの融解を始めます。手順については、『MiSeq System User Guide』（パーツ番号：15027617）を参照してください。

多様性の低いライブラリーについて

多様性の低いライブラリーは、かなりの数のリードに同じシーケンスが含まれるライブラリーです。このようにばらつきが少ない場合、リードがランダムでないため、塩基組成が変化します。

例えば、1種類の転写が25%を超えるいくつかの発現解析か、低プレックスのアンプリコンプール、アダプターダイマー、またはバイサルファイトシーケンシングにおいて、低い多様性が発生する可能性があります。高濃度 PhiX の添加は、シーケンスの多様性が全体的に低い場合にバランスを取るのに役立ちます。



注意

多様性の低いライブラリーの場合、PhiX コントロールライブラリーを変性済みのライブラリーと同じ濃度に希釈してください。

消耗品および機器

消耗品

MiSeq でのシーケンス用に DNA ライブラリーを調製するには、以下の消耗品が必要です。

| 消耗品 | サプライヤー |
|--|--------------------------------------|
| HT1 (ハイブリダイゼーションバッファー)、融解および事前冷却済み | イルミナ、MiSeq Reagent Kit と一緒に提供 |
| (オプション) イルミナ PhiX Control | イルミナ、カタログ番号：FC-110-3001 |
| 1.0 N NaOH、分子生物学用グレード | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| Tris-Cl 10 mM、pH 8.5 と 0.1% の Tween 20 | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| Tris-HCl、pH 7.0 | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| (プロトコール C) 低 TE | イルミナ、Ampliseq Library PLUS キットと一緒に提供 |

機器

以下の機器は、ビーズベースの方法を使用してノーマライズされているライブラリーの変性に使用します。

| 機器 | サプライヤー |
|-----------------------------|--|
| Hybex Microsample Incubator | SciGene、カタログ番号：1057-30-O (115 V) または同等品 SciGene、カタログ番号：1057-30-2 (230 V) または同等品 |
| 1.5 mL マイクロチューブ用のブロック | SciGene、カタログ番号：1057-34-0 または同等品 |

プロトコール A：標準的なノーマライゼーション法

ライブラリー調製の文書で推奨されている標準的なライブラリー定量手順と品質管理手順を使用してノーマライズされているライブラリーは、プロトコール A を使用して変性および希釈します。

使用するライブラリーと MiSeq Reagent Kit のバージョンに最適な手順に従ってください。また、ローディング濃度は、ライブラリーのタイプおよび定量方法によって異なる場合があります。

Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit の場合、『Nextera DNA Flex Library Prep Reference Guide』(文書番号：1000000025416) に記載されている変性および希釈の指示を参照してください。

TruSight™ Cardio Sequencing Kit の場合、『TruSight Cardio Sequencing Kit Reference Guide』(文書番号：15063774) に記載されている変性および希釈の指示を参照してください。

| ケミストリー | 適合する変性および希釈の手順 |
|----------------------|--|
| MiSeq Reagent Kit v3 | 4 nM ライブラリー：6～20 pM のローディング濃度が得られます。 |
| MiSeq Reagent Kit v2 | 4 nM ライブラリー：6～20 pM のローディング濃度が得られます。 2 nM ライブラリー：6～10 pM のローディング濃度が得られます。 |

本ガイドで説明している変性手順では、HT1 で希釈した後の最終溶液の NaOH 濃度が確実に 0.001 (1 mM) 以下になります。ライブラリー内の NaOH 濃度が高いと、フローセルへのライブラリーハイブリダイゼーションが抑制され、クラスター密度が減少します。

試薬の調製

NaOH の新しい希釈物の調製

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (800 μ L)
 - ▶ ストック 1.0 N NaOH (200 μ L)
 1 mL の 0.2 N NaOH が得られます。
- 2 チューブを数回転倒混和します。

注意

新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

- 1 HT1 を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- 2 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、 2°C ~ 8°C で保管します。

4 nM ライブラリーの変性

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ 4 nM ライブラリー (5 μ L)
 - ▶ 0.2 N NaOH (5 μ L)
- 2 軽くボルテックスして、 $280 \times g$ で 1 分間遠心します。
- 3 室温で 5 分間インキュベートします。
- 4 変性済みライブラリーを含むチューブに、990 μ L の事前冷却済み HT1 を添加します。
1 mL の 20 pM 変性済みライブラリーが得られます。

変性済み 20 pM ライブラリーの希釈

- 1 以下の容量を使用して、目的の濃度に希釈します。

| 濃度 | 6 pM | 8 pM | 10 pM | 12 pM | 15 pM | 20 pM |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 20 pM ライブラリー | 180 μ L | 240 μ L | 300 μ L | 360 μ L | 450 μ L | 600 μ L |
| 事前冷却済み HT1 | 420 μ L | 360 μ L | 300 μ L | 240 μ L | 150 μ L | 0 μ L |

- 2 転倒混和し、パルス遠心します。
- 3 PhiX コントロールを添加する場合は、10 ページの「PhiX コントロールの変性と希釈」に進みます。そうでない場合は、12 ページの「次の手順」を参照してください。

2 nM ライブラリーの変性

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ 2 nM ライブラリー (5 μ L)
 - ▶ 0.2 N NaOH (5 μ L)
- 2 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。
- 3 室温で 5 分間インキュベートします。
- 4 変性済みライブラリーを含むチューブに、990 μ L の事前冷却済み HT1 を添加します。1 mL の 10 pM 変性済みライブラリーが得られます。

変性済み 10 pM ライブラリーの希釈

- 1 以下の容量を使用して、目的の濃度に希釈します。

| 濃度 | 6 pM | 8 pM | 10 pM |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| 10 pM ライブラリー | 360 μ L | 480 μ L | 600 μ L |
| 事前冷却済み HT1 | 240 μ L | 120 μ L | 0 μ L |

- 2 転倒混和し、パルス遠心します。
- 3 PhiX コントロールを添加する場合は、10 ページの「PhiX コントロールの変性と希釈」に進みます。そうでない場合は、12 ページの「次の手順」を参照してください。

プロトコール B：ビーズベースのノーマライゼーション法

ライブラリー調製の文書に記載されているビーズベースのノーマライゼーションをサポートする方法に示された、ビーズベースの手順を用いてノーマライズされ、プーリングされているライブラリーを変性および希釈するには、プロトコール B を使用します。

ビーズベースのノーマライゼーション手順は、場合によって異なる可能性があります。ライブラリーの実際の容量は、ライブラリーのタイプおよび経験によって異なります。また、ローディング濃度は、ライブラリーのタイプおよび定量方法によって異なる場合があります。

TruSight HLA Sequencing Kit の場合、『TruSight HLA v1 Sequencing Kit Reference Guide』（文書番号：15056536）または『TruSight HLA v2 Sequencing Kit Reference Guide』（文書番号：1000000010159）に記載されている変性および希釈の指示を参照してください。

HT1 の準備

- 1 HT1 を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- 2 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、2°C ~ 8°C で保管します。

インキュベーターの準備

- 1 インキュベーターを 98°C に予熱します。

ライブラリーをローディング濃度に希釈

- 1 マイクロチューブに以下の容量のプーリング済みライブラリーと事前冷却済み HT1 を混ぜ合わせます。総容量は 600 μ L です。クラスター密度の結果が高すぎるまたは低すぎる場合、希釈率を調整します。12 ページの「BBN ローディング濃度の例外」を参照して、使用するキットに必要なローディング容量が、一般的なアンプリコンの推奨量と異なるかどうかを確認してください。

表 1 一般的なアンプリコンの推奨量

| ライブラリープール | 事前冷却済み HT1 | ケミストリー |
|------------------|-------------------|-----------------------------|
| 6 μL | 594 μL | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 7 μL | 593 μL | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 8 μL | 592 μL | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 9 μL | 591 μL | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 10 μL | 590 μL | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |

- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。

希釈済みライブラリーの変性

- チューブを予熱済みのインキュベーターに 2 分間置きます。
- すぐに氷上で冷却します。
- 氷上に 5 分間置きます。
- PhiX コントロールを添加する場合は、10 ページの「PhiX コントロールの変性と希釈」に進みます。そうでない場合は、12 ページの「次の手順」を参照してください。

プロトコール C : AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法

標準的な AmpliSeq for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈する場合は、プロトコール C を使用します。最終的なローディング濃度と容量は、ライブラリー調製方法と定量方法によって異なります。シーケンスランごとにサポートされるライブラリー数の詳細については、[イルミナのサポートウェブサイト](#)にアクセスし、使用するパネルの AmpliSeq for Illumina サポートページを参照してください。

試薬の調製

NaOH の新しい希釈物の調製

- マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (800 μL)
 - ▶ ストック 1.0 N NaOH (200 μL)
 1 mL の 0.2 N NaOH が得られます。
- チューブを数回転倒混和します。

注意

新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

- HT1 を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、 2°C ~ 8°C で保管します。

低 TE の準備

- 凍結している場合、低 TE を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- ライブラリーを希釈する準備ができるまで、融解した低 TE を室温で保管します。

ライブラリーの希釈

- 1 新しい96ウェル LoBind PCR プレートで、低 TE を使用して各ライブラリーを 2 nM に希釈します。

ライブラリーのプーリング

- 1 各 2 nM ライブラリーを、同じ容量だけプレートから 1.5 mL LoBind チューブに移します。
該当する場合は、DNA ライブラリーおよび RNA ライブラリーに別々のチューブを必ず使用してください。
- 2 各チューブをボルテックスして混合します。
- 3 各チューブを短時間遠心します。
- 4 DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを 1 つのシーケンスランにグループ化する場合は、DNA ライブラリープールと RNA ライブラリープールを次の比率で混合します。

| パネル | DNA と RNA の比率 |
|--|---------------|
| AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel | 8:1 |
| AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel | 5:1 |
| AmpliSeq for Illumina Focus Panel | 7:3 |
| AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3 | 25:1 |

- 5 プールを混合してから、チューブをボルテックスして混合した後、短時間遠心します。

ライブラリーの変性

- 1 マイクロチューブに以下の分量のライブラリーと新しく希釈した 0.2 N NaOH を混合します。

| 試薬 | 容量 (μL) |
|---------------|---------|
| プーリングしたライブラリー | 10 |
| 0.2 N NaOH | 10 |

- 2 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。
- 3 室温で 5 分間インキュベートします。
- 4 2 nM プーリング済みライブラリーを含むチューブに、10 μL の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。
- 5 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。

20 pM への変性済みライブラリーの希釈

- 1 2 nM 変性済みライブラリープールのチューブに、970 μL の事前冷却済み HT1 を添加します。
20 pM 変性済みライブラリーが得られます。
- 2 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。
- 3 最終希釈に進む準備ができるまで、20 pM ライブラリーを氷上に置きます。

最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈

- 1 事前冷却済み HT1 を使用して、変性済み 20 pM ライブラリー溶液を最終容量 600 μL で 7 ~ 9 pM に希釈します。
- 2 転倒混和した後、短時間遠心します。

安全なストップポイント

停止する場合は、プレートを密閉し、-25°C ~ -15°C で保管します。

プロトコール D : AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法

AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈する場合は、プロトコール D を使用します。AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを使用して調製したライブラリーは、サンプルプーリングに適した開始濃度にノーマライズされています。シーケンスランごとにサポートされるライブラリー数の詳細については、[イルミナのサポートウェブサイト](#)にアクセスし、使用するパネルの AmpliSeq for Illumina サポートページを参照してください。

試薬の調製

NaOH の新しい希釈物の調製

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (800 μ L)
 - ▶ ストック 1.0 N NaOH (200 μ L)
 1 mL の 0.2 N NaOH が得られます。
- 2 チューブを数回転倒混和します。



注意

新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

- 1 HT1 を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- 2 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、2°C ~ 8°C で保管します。

ライブラリーのプーリング

- 1 各ライブラリーを同じ容量だけプレートから 1.5 mL LoBind チューブに移します。該当する場合は、DNA ライブラリーおよび RNA ライブラリーに別々のチューブを必ず使用してください。
- 2 各チューブをボルテックスして混合します。
- 3 各チューブを短時間遠心します。
- 4 DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを 1 つのシーケンスランにグループ化する場合は、DNA ライブラリープールと RNA ライブラリープールを次の比率で混合します。

| パネル | DNA と RNA の比率 |
|--|---------------|
| AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel | 8:1 |
| AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel | 5:1 |
| AmpliSeq for Illumina Focus Panel | 7:3 |
| AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3 | 25:1 |

- 5 プールを混合してから、チューブをボルテックスして混合した後、短時間遠心します。

ライブラリーの変性

- 1 マイクロチューブに以下の分量のライブラリーと新しく希釈した 0.2 N NaOH を混合します。

| 試薬 | 容量 (μL) |
|---------------|---------|
| プーリングしたライブラリー | 10 |
| 0.2 N NaOH | 10 |

- 2 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。
- 3 室温で 5 分間インキュベートします。
- 4 プーリング済みライブラリーを含むチューブに、10 μL の 200 mM Tris-HCl、pH 7.0 を添加します。
- 5 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。

変性済みライブラリーの希釈

- 1 変性済みライブラリープールのチューブに、970 μL の事前冷却済み HT1 を添加します。
- 2 短時間ボルテックスした後、短時間遠心します。
- 3 最終希釈に進む準備ができるまで、ライブラリーを氷上に置きます。

最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈

- 1 以下の容量を混合して、変性済みライブラリー溶液を最終ローディング濃度に希釈します。
 - ▶ 変性済みライブラリー (385 μL)
 - ▶ HT1 (215 μL)
- 2 転倒混和した後、短時間遠心します。

安全なストップポイント

停止する場合は、プレートを密閉し、-25°C ~ -15°C で保管します。

PhiX コントロールの変性と希釈

以下の手順に従って、シーケンスコントロールとして使用するために PhiX ライブラリーを変性および希釈します。

使用する MiSeq reagent kit のバージョンに適した手順に従います。

| ケミストリー | 最終 PhiX 濃度 |
|----------------------|---|
| MiSeq Reagent Kit v3 | 変性済みの PhiX コントロールを 20 pM に希釈します。これにより、v3 試薬を使用した最適なクラスター密度が得られます。 |
| MiSeq Reagent Kit v2 | 変性済みの PhiX コントロールを 12.5 pM に希釈します。これにより、v2 試薬を使用した最適なクラスター密度が得られます。 |

4 nM への PhiX の希釈

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ 10 nM PhiX ライブラリー (2 μL)
 - ▶ 10 mM Tris-Cl、pH 8.5 と 0.1% の Tween 20 (3 μL)
- 2 **12 時間**以内に調製しなかった場合は、新しい 0.2 N NaOH の希釈液を調製します。

PhiX コントロールの変性

- 1 マイクロチューブに以下の容量を混ぜ合わせます。
 - ▶ 4 nM PhiX ライブラリー (5 μ L)
 - ▶ 0.2 N NaOH (5 μ L)
- 2 短時間ボルテックスして混合します。
- 3 280 \times g で 1 分間遠心します。
- 4 室温で 5 分間インキュベートします。

20 pM への変性済み PhiX の希釈

- 1 変性済み PhiX ライブラリーに事前冷却済み HT1 を添加します。
 - ▶ 変性済み PhiX ライブラリー (10 μ L)
 - ▶ 事前冷却済み HT1 (990 μ L)
 1 mL の 20 pM PhiX ライブラリーが得られます。
- 2 転倒混和します。

注意

変性済みの 20 pM PhiX ライブラリーを -15°C ~ -25°C で最長 3 週間保管できます。3 週間経過すると、クラスター数が減少する傾向があります。

12.5 pM への変性済み PhiX の希釈

MiSeq Reagent Kit v3 を使用する場合は、さらに希釈する必要はありません。

- 1 変性済み PhiX ライブラリーに事前冷却済み HT1 を添加します。
 - ▶ 20 pM 変性済み PhiX ライブラリー (375 μ L)
 - ▶ 事前冷却済み HT1 (225 μ L)
 600 μ L の 12.5 pM PhiX ライブラリーが得られます。
- 2 転倒混和します。

ライブラリーと PhiX コントロールの混合

ほとんどのライブラリーでは、シーケンスコントロールとして 1% の低濃度 PhiX コントロール添加を使用します。多様性の低いライブラリーでは、PhiX コントロール添加を少なくとも 5% に増やします。

- 1 以下の容量の変性済み PhiX コントロールと変性済みライブラリーを混ぜ合わせます。

| | ほとんどのライブラリー (1% の添加) | 多様性の低いライブラリー (5% 以上の添加) |
|---|-------------------------|----------------------------|
| 変性および希釈済みの PhiX | 6 μ L | 30 μ L |
| 変性および希釈済みのライブラリー (プロトコール A、B、C、 または D によるもの) | 594 μ L | 570 μ L |

- 2 試薬カートリッジにロードする準備ができるまで、氷上に置いておきます。

注意

実際の PhiX の割合はライブラリープールのクオリティと量により異なります。

補足情報

BBN ローディング濃度の例外

表 2 Nextera XT DNA

| ライブラリープール | 事前冷却済み HT1 | ケミストリー |
|------------|-------------|-----------------------------|
| 24 μ L | 576 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 および v2 |



注意

24 μ L は、Nextera XT DNA の推奨開始容量です。

表 3 TruSight Myeloid Sequencing Panel

| ライブラリープール | 事前冷却済み HT1 | ケミストリー |
|------------|-------------|----------------------|
| 20 μ L | 580 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 |
| 6 μ L | 594 μ L | MiSeq Reagent Kit v2 |

表 4 TruSeq™ Custom Amplicon v1.5

| ライブラリープール | 事前冷却済み HT1 | ケミストリー |
|------------|-------------|----------------------|
| 20 μ L | 580 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 |
| 6 μ L | 594 μ L | MiSeq Reagent Kit v2 |

表 5 TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit

| ライブラリープール | 事前冷却済み HT1 | ケミストリー |
|------------|-------------|-----------------------------|
| 7 μ L | 593 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 8 μ L | 592 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 9 μ L | 591 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |
| 10 μ L | 590 μ L | MiSeq Reagent Kit v3 または v2 |

次の手順

ライブラリーを変性させて希釈し、オプションの PhiX コントロールを調製したら、ライブラリーを試薬カートリッジにロードし、シーケンスランをセットアップする準備が整います。『MiSeq System User Guide』（パーツ番号：15027617）を参照してください。

改訂履歴

| 文書番号 | 日付 | 変更内容 |
|-----------------------|--------------|---|
| 文書番号：15039740 v10 | 2019年 2月 | プロトコル C の推奨される最終ローディング濃度の表を単一の推奨濃度範囲に置き換え。 |
| 文書番号：15039740 v09 | 2018年 11月 | プロトコル D の AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel のプーリング率を修正。 |
| 文書番号：15039740 v08 | 2018年 11月 | プロトコル C の AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel のプーリング率を修正。 AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Research Assay Panel のプーリング率を追加。 |
| 文書番号：15039740 v07 | 2018年 10月 | AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈するためのプロトコル D を追加。 |
| 文書番号：15039740 v06 | 2018年 7月 | AmpliSeq Myeloid Panel for Illumina のプーリング率を追加。 |
| 文書番号：15039740 v05 | 2018年 5月 | プロトコル C での PhiX の使用に関する警告を削除。 |
| 文書番号：15039740 v04 | 2018年 4月 | AmpliSeq for Illumina パネルを変性および希釈するためのプロトコル C を追加。 |
| 文書番号：15039740 v03 | 2017年 12月 | Nextera DNA Flex Library Prep Kit を使用する場合、『Nextera DNA Flex Library Prep Reference Guide』を参照することをプロトコル A の推奨事項として追加。 |
| 文書番号：15039740 v02 | 2017年 2月 | TruSeq Myeloid Sequencing Panel、TruSeq Custom Amplicon v1.5、および TruSeq Custom Amplicon Low Input Sequencing Kit のローディング濃度に関する推奨事項を追加。 |
| 文書番号：15039740 v01 | 2016年 1月 | ビーズベースの手順を使用してノーマライズされているライブラリーの変性および希釈の手順を追加。手順をプロトコル A およびプロトコル B として構成。 |
| パーツ番号：15039740 Rev. D | 2013年 11月 | 多様性の低いライブラリーの場合、PhiX コントロールライブラリーを変性済みのサンプルライブラリーと同じ濃度に希釈することを推奨事項として追加。 |
| パーツ番号：15039740 Rev. C | 2013年 8月 | 分子生物学グレードの NaOH を使用することを推奨事項として追加。 MiSeq Reagent Kit v3 で使用する推奨のライブラリー変性と PhiX コントロールプロトコルを追加。 サンプルライブラリーのロードに関する情報を削除。この情報は『MiSeq System User Guide』（パーツ番号：15027617）に存在。 |
| パーツ番号：15039740 Rev. B | 2013年 3月 | 多様性の低いライブラリーの PhiX の推奨を 25% 以上から 5% 以上に削減。 この変更は、MCS v2.2 とともにリリースされる RTA 1.17.28 以降で使用する場合に可能。 変性済みの 10 pM ライブラリーで得られる NaOH 濃度を 1 mM に修正。 調製済みライブラリーと PhiX コントロールを混合して総容量を 600 μ L にするための手順を更新。 |
| パーツ番号：15039740 Rev. A | 2013年 1月 | 初版リリース。 |

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 |
|----------|-----------------|----------------|
| アイルランド | +353 1800936608 | +353 016950506 |
| イタリア | +39 800985513 | +39 236003759 |
| 英国 | +44 8000126019 | +44 2073057197 |
| オーストラリア | +1.800.775.688 | |
| オーストリア | +43 800006249 | +43 19286540 |
| オランダ | +31 8000222493 | +31 207132960 |
| 韓国 | +82 80 234 5300 | |
| シンガポール | +1.800.579.2745 | |
| スイス | +41 565800000 | +41 800200442 |
| スウェーデン | +46 850619671 | +46 200883979 |
| スペイン | +34 911899417 | +34 800300143 |
| 台湾 (中国) | 00806651752 | |
| 中国 | 400.066.5835 | |
| デンマーク | +45 80820183 | +45 89871156 |
| ドイツ | +49 8001014940 | +49 8938035677 |
| 日本 | 0800.111.5011 | |
| ニュージーランド | 0800.451.650 | |
| ノルウェー | +47 800 16836 | +47 21939693 |
| フィンランド | +358 800918363 | +358 974790110 |
| フランス | +33 805102193 | +33 170770446 |
| ベルギー | +32 80077160 | +32 34002973 |
| 北米 | +1.800.809.4566 | |
| 香港 (中国) | 800960230 | |
| その他の国 | +44.1799.534000 | |

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：イルミナのウェブサイトから PDF 形式でダウンロードできます。jp.support.illumina.com にアクセスして製品を選び、[Documentation & Literature] を選択してください。



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。

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®