

illumina®

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus, Ribo-Zero Plus Microbiome

Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号 : 1000000124514 v03 JPN

2022年6月

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。

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.

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

改訂履歴

| 文書 | 日付 | 変更内容 |
|----------------------------|------------|--|
| 文書番号： 1000000124514 v03 | 2022 年 6 月 | <p>追加</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ribo-Zero Plus Microbiome キットを追加し、「プローブのハイブリダイゼーション」ステップを更新 • 本ガイド全体で必要に応じて DPM キットを消耗品に追加 • 試薬の取り扱いにおけるサンプルの複数回使用に関するガイダンス • インプット RNA の推奨定量手法 <p>更新</p> <ul style="list-style-type: none"> • 文書タイトルに「Ribo-Zero Plus Microbiome」を追加 • アンカープレートの色についての記載 • 1 サイクル目のダークサイクルを含む NextSeq 2000 カスタムレシピ • 「消耗品および機器」に、NextSeq 2000 ユーザー向けに KAPA qPCR Library Quantification Kit と qPCR 装置を追加 • Bioanalyzer によるトレースに関して、使用する抽出手法の実行中に DNase 処理を実施する必要がある旨とダイマーのピークを追加 • 消耗品をアルファベット順に整理 • スタイルガイドに合わせて全体の表現と書式を変更 • 「ライブラリーのチェック」ステップを更新して明確化 |
| 文書番号： 1000000124514 v02 | 2021 年 4 月 | <p>対応可能な rRNA 除去ターゲットを更新。 NextSeq 1000/2000 システムの希釈と定量に関する情報を追加。 EPH3 および FSA の定義を修正。</p> |
| 文書番号： 1000000124514 v01 | 2020 年 8 月 | <p>PCR 増幅の表からインプット量 1 ~ 10 ng を削除し、インプット量 1 ng の行とインプット量 10 ng の行に差替え。 ワークフローの図を更新し、処理時間の算出に用いるサンプル数を追加。インデックスのキット名の形式を修正。</p> |
| 文書番号： 1000000124514 v00 | 2020 年 6 月 | 初版。 |

目次

| | |
|---------------------------|----------|
| 改訂履歴 | iii |
| 概要 | 1 |
| RNA インプット量に関する推奨事項 | 1 |
| 追加リソース | 2 |
| プロトコール | 3 |
| はじめに | 3 |
| プーリングの準備 | 3 |
| ビーズの取り扱い | 3 |
| ヒントおよびテクニック | 4 |
| ライブラリー調製のフロー図 | 5 |
| rRNA の除去 | 6 |
| 事前準備 | 7 |
| 手順 | 8 |
| RNA の断片化と変性 | 10 |
| 事前準備 | 10 |
| 手順 | 10 |
| 1st strand cDNA の合成 | 11 |
| 事前準備 | 11 |
| 手順 | 12 |
| 2nd strand cDNA の合成 | 12 |
| 事前準備 | 12 |
| 手順 | 13 |
| 3' 末端のアデニル化 | 14 |
| 事前準備 | 14 |
| 手順 | 14 |
| アンカーのライゲーション | 15 |
| 事前準備 | 15 |
| 手順 | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 断片のクリーンアップ | 16 |
| 手順 | 17 |
| ライブラリーの増幅 | 18 |
| 事前準備 | 18 |
| 手順 | 19 |
| ライブラリーのクリーンアップ | 20 |
| 事前準備 | 20 |
| 手順 | 20 |
| ライブラリーのチェック | 22 |
| ライブラリーの開始濃度への希釈 | 23 |
| T- オーバーハングのトリミング (オプション) | 24 |
| 付録 A サポート情報 | 25 |
| はじめに | 25 |
| 略語 | 25 |
| キットの内容と保管条件 | 26 |
| Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 Samples) (20040525) | 27 |
| Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Samples) (20040529) | 28 |
| Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 Samples) (20072063) | 29 |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040553) | 30 |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040554) | 30 |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (2004555) | 30 |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040556) | 30 |
| 消耗品および機器 | 31 |
| 消耗品 | 31 |
| 機器 | 32 |
| テクニカルサポート | 33 |

概要

Illumina® Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus キットおよび Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome キットは、トータル RNA を、最大 384 のデュアルインデックスライブラリーに変換します。具体的には、除去試薬が結合して、トータル RNA からアバンダントな転写産物を除去します。次に、残った RNA を逆転写により cDNA に変換し、その後のライゲーションおよび増幅のステップでアダプターを付加して、イルミナのシステムでクラスター形成とシーケンスを行えるようにします。

本キットには次のような特徴があります。

- 酵素的手法による、トータル RNA からのアバンダントな転写産物の除去
- コーディング RNA やさまざまな形態のノンコーディング RNA を解析するためのライブラリー調製
- RNA 転写産物のストランド情報
- IDT for Illumina RNA UD Index 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

Ribo-Zero Plus のプロトコールは、インプット量 10 ~ 100 ng の RNA 向けに最適化されています。高品質の RNA サンプル (RIN 値 ≥ 9) であれば 1 ~ 1000 ng の精製トータル RNA インプット量、低品質の RNA サンプル (RIN 値 ≥ 2) や FFPE サンプル (DV200 値 $> 55\%$) であれば 10 ~ 100 ng の RNA インプット量に対応します。インプット量が少なかったり、RNA の品質が低かったりすると、ライブラリーの性能が変動することがあります。

Ribo-Zero Plus Microbiome のプロトコールは、インプット量 25 ~ 500 ng のトータル RNA 向けに最適化されています。RIN 値が 5 以上の RNA の使用を推奨します。インプット量が少なかったり、RNA の品質が低かったりすると、ライブラリーの性能が変動することがあります。

これらのプロトコールでは、以下のターゲットから rRNA を除去することができます。

i | Illumina Total RNA with Ligation Ribo-Zero Plus Microbiome (96 reactions) (カタログ番号 20072063) は微生物 rRNA を除去します。詳細については、表に記載されている項目を参照してください。

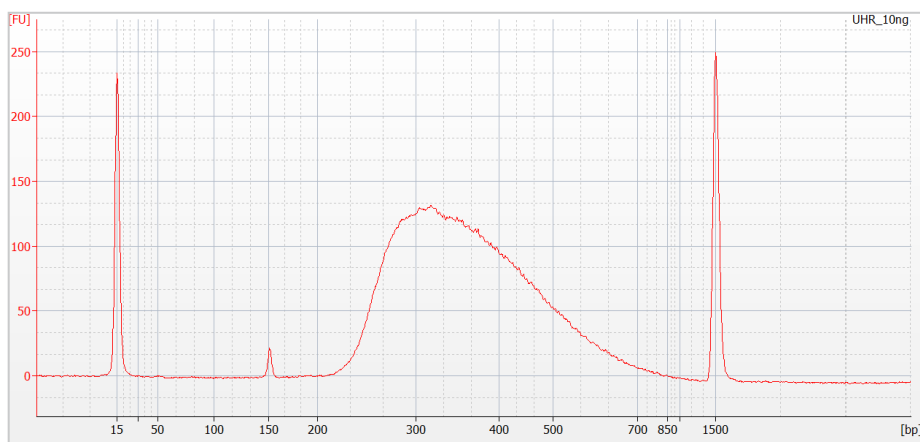
| 除去ターゲット | rRNA ターゲット |
|----------------|---|
| ヒト細胞質 rRNA | 28S、18S、5.8S、5S |
| ヒトミトコンドリア rRNA | 12S、16S |
| ヒトβグロビン転写産物 | HBA1、HBA2、HBB、HBG1、HBG2 |
| マウスとラット | 12S、16S、28S、18S、5.8S、5S |
| グラム陰性菌 rRNA | 大腸菌：5S、16S、23S |
| グラム陽性菌 rRNA | 枯草菌：5S、16S、23S |
| 微生物 rRNA* | 大人と乳幼児に共通の細菌種や ATCC MSA-2002、MSA-2005、MSA-2006 などの多様な微生物：5S、16S、23S |

*Illumina Stranded Total Ribo-Zero Plus Microbiome キット (カタログ番号 20072063) のみに含まれています。rRNA 除去はヒト微生物 rRNA 向けに最適化されており、その他のサンプルタイプを使用した場合には性能が変動することがあります。

RNA 抽出の手法には DNase 処理も含めてください。DNase 処理は、使用する抽出手法の実行中に実施する必要があります。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 を定量し、フラグメントを解析する手法により品質を調べます。

下の図は、Universal Human Reference(UHR)トータルRNAをインプットした場合のトレースの見本です。トレースには、2100 Bioanalyzer SystemとRNA 6000 Pico Kitを使用しました。

図 1 UHR をインプットした場合のトレースの例



追加リソース

以下のリソースには、Illumina Stranded Total RNA Prep キットを使用してライブラリーを調製するための手順とガイドラインが記載されています。詳細については、Illumina Stranded Total RNA Prep 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、および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
- 関連する製品およびトピックの各種コース
- 本キットの最新版マニュアル

| リソース | 説明 |
|---|---|
| Custom Protocol Selector | ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、解析法に合わせて、詳細レベルを調整した End-to-End の説明書を作成するツールです。 |
| 『Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Checklist』 (文書番号: 1000000124515) | 経験豊富なユーザー向けの手順チェックリストです。 |
| 『Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Consumables & Equipment』 (文書番号: 1000000124517) | ユーザー側で用意する消耗品および機器について、入力形式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) | イルミナシーケンス製品に用いられているイルミナのオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が記載されています。 |

プロトコール

はじめに

本章では、Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus の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、インデックスアンカー、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。全項目の一覧表については、[25 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 Stranded Total RNA Prep のサポートページか、使用す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 RNA UD Index を使用して、最初にアンカーを付加し、次に UD インデックスを付加する 2 つの別のステップでライブラリーにインデックスを付けます。UD 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：1000000002694）を参照してください。

ビーズの取り扱い

本プロトコールでは、Agencourt RNAClean XP と、Agencourt AMPure XP という、2 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るため、他のもので代用することはできません。

ビーズを取り扱う際は、以下の方法で行ってください。

- ビーズは室温で使用してください。
- 2°C 未満で保管されていたビーズは**使用しないでください**。
- ビーズは、毎回の使用前と、プロトコールの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、均一に分布しており、色も均一になっています。
- 液体をビーズペレットに直接分注し、ウェル側面のビーズにも液体がかかるようにしてください。
- プレートが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°C ～ -65°C で最長 1 年間保存可能です。
 - ▶ 同じサンプルを複数回使用する場合は、チューブに小分け ($7.5\ \mu\text{L}$ 以下) 分注し、使い切りとしてください。
- 融解した試薬は必要な時まで氷上に置いておいてください。試薬はすべて、使用後、保管場所に正しく戻してください。
- 使わないときは、プレートにシールし、試薬のキャップを閉めて、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' シーリングフィルムを使用してください。このシールは -40°C ～ 110°C 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シールしてください。
- プレートから取り外したシールは、使用後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。

混合と遠心

- 本プロトコールでは、攪拌による混合か、ピペッティングによる混合のいずれかを選択することができます。それぞれの混合方法に適した磁気スタンドを使用してください。
 - ▶ ピペッティングによる混合を選択した場合は、Magnetic Stand-96 を使用してください。
 - ▶ 攪拌による混合を選択した場合は、DynaMag-96 Side Magnet を使用してください。
- 各ステップにおいて、 $280 \times g$ で 10 秒間遠心することで、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。

ライブラリー調製のフロー図

下の図に、24 サンプルを用いた場合の Illumina Stranded Total RNA Prep のプロトコールの概要を示します。ステップとステップの間にセーフストップポイントがあります。



rRNA の除去

このステップでは、精製トータル RNA から大量の rRNA を取り除きます。DNA プローブが結合することで、標的 rRNA が酵素的に分解され、アブダントな転写産物が除去されたトータル RNA が生成されます。

次に、RNA 特異的な磁気ビーズが、rRNA を取り除いた RNA を回収し、精製します。この精製により、残存する塩やバッファーが取り除かれます。

消耗品

- DB1 (Depletion Probe Buffer) (青色キャップ)
- DP1 (Depletion Probe Pool) (青色キャップ)
- DPM (Microbiome Depletion Probe Pool) (透明キャップ)。DPM が含まれるのは Ribo-Zero Plus Microbiome キット (カタログ番号 20072063) のみ
- ELB (Elution Buffer)
- PRB (Probe Removal Buffer) (赤色キャップ)
- PRE (Probe Removal Enzyme) (赤色キャップ)
- RDB (RNA Depletion Buffer) (黄色キャップ)
- RDE (RNA Depletion Enzyme) (黄色キャップ)
- Agencourt RNAClean XP
- 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー超純水
- 1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー) (3)
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き) (2)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ EPH3 (Elute, Prime, Fragment 3HC Mix)
 - ▶ FSA (First Strand Synthesis Mix)

試薬について

- 80% EtOH は用時調製し、1 日経ったものは廃棄してください。本プロトコールには、用時調製 80% EtOH が必要となるクリーンアップステップが 4 つあります。

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 |
|-------------|------------|------------------------------------|
| DB1 | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| DP1 | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| DPM | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| ELB | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| EPH3 | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| FSA | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| PRB | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| PRE | -25℃～ -15℃ | 必要時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。 |
| RDB | -25℃～ -15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| RDE | -25℃～ -15℃ | 必要な時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。 |
| RNAclean 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。 |

2. 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。
3. サーマルサイクラーに次の HYB_DP1 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、100℃に設定
 - 反応量を 15 μ L に設定
 - 95℃で 2 分間
 - 37℃に達するまで毎秒 0.1℃ずつ温度を下げる
 - 37℃で保持
4. 以下の RNA_DEP 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℃に設定
 - 反応量を 20 μ L に設定
 - 37℃で 15 分間
 - 4℃で保持
5. 以下の PRB_REM 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℃に設定
 - 反応量を 30 μ L に設定
 - 37℃で 15 分間
 - 70℃で 15 分間
 - 4℃で保持

手順

プローブのハイブリダイゼーション

Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus の場合

Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus Microbiome を使用する場合は、[8 ページの「Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus Microbiome の場合」](#)の「プローブのハイブリダイゼーション」に進みます。

1. 1 ~ 1000 ng のトータル RNA を、体積が 11 μ L となるようにヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、新しい PCR プレートの各ウェルに加えます。
2. 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、Hybridize Probe 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。
 - DB1 (3.6 μ L)
 - DP1 (1.2 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。
3. Hybridize Probe Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
4. 各ウェルに Hybridize Probe Master Mix を 4 μ L ずつ添加します。
5. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
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、HYB_DP1 プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 15 分程で、各ウェルの総液量は 15 μ L です。
7. [9 ページの「rRNA の除去」](#)に進みます。

Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus Microbiome の場合

1. 25 ~ 500 ng のトータル RNA を、体積が 10 μ L となるようにヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、新しい PCR プレートの各ウェルに加えます。
2. 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、Hybridize Probe 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。
 - DB1 (3.6 μ L)
 - DP1 (1.2 μ L)
 - DPM (1.2 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。
3. Hybridize Probe Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
4. 各ウェルに Hybridize Probe Master Mix を 5 μ L ずつ添加します。
5. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
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、HYB_DP1 プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 15 分程で、各ウェルの総液量は 15 μ L です。
7. [9 ページの「rRNA の除去」](#)に進みます。

rRNA の除去

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、rRNA Depletion 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。
 - RDB (4.8 μ L)
 - RDE (1.2 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. rRNA Depletion Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
3. シールされた PCR プレート を 280 \times g で 10 秒間遠心します。
4. 各ウェルに rRNA Depletion Master Mix を 5 μ L ずつ添加します。
5. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
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、RNA_DEP プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 17 分程で、各ウェルの総液量は 20 μ L です。

プローブの除去

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、Probe Removal 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。
 - PRB (7.7 μ L)
 - PRE (3.3 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. Probe Removal Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
3. シールされた PCR プレート を 280 \times g で 10 秒間遠心します。
4. 各ウェルに Probe Removal Master Mix を 10 μ L ずつ添加します。
5. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
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、PRB_REM プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 32 分程で、各ウェルの総液量は 30 μ L です。

RNA のクリーンアップ

1. シールされた PCR プレート を 280 \times g で 10 秒間遠心します。
2. RNAClean XP をボルテックスして懸濁します。
3. 各ウェルに RNAClean XP を 60 μ L ずつ添加します。
4. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 \times g で 10 秒間遠心します。
 - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
7. 上清 80 μ L を取り除き、廃棄します。
8. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製した 80% EtOH を 175 μ L ずつ添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。

9. **2回目**のビーズ洗浄を行います。
10. 20 μ L ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
11. 磁気スタンド上で2分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
12. 磁気スタンドからプレートを下ろします。
13. 各ウェルに ELB を 10.5 μ L 添加します。
14. 次のいずれかの方法で混合します。
 - プレートにシールした後、280 \times g で 10 秒間遠心します。その後、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - 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、シールします。
15. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、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、シールします。
16. 室温で2分間インキュベートします。
17. 280 \times g で 10 秒間遠心します。
18. 磁気スタンドに載せ、2分間待ちます。
19. 新しいPCRプレートの、対応する各ウェルに、上清8.5 μ L を移します。少量のビーズのキャリーオーバーがあっても性能には影響ありません。

RNA の断片化と変性

このステップでは、精製後のトータル RNA を断片化し、ランダムヘキサマーをアニールすることで、cDNA 合成にむけてサンプルを処理します。

消耗品

- EPH3 (Elute, Prime, Fragment 3HC Mix)

事前準備

1. 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
 - 反応量を 17 μ L に設定
 - 94°Cで2分間
 - 4°Cで保持

手順

1. 各ウェルに EPH3 を 8.5 μ L 添加します。
2. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
3. 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 4 分程で、各ウェルの総液量は 17 μ L です。

1st strand cDNA の合成

このステップでは、ヘキサマーでプライミングした RNA 断片を逆転写し、1st strand 相補的 DNA (cDNA) を生成します。First Strand Synthesis Mix はアクチノマイシン D を含有しています。アクチノマイシン D は、擬似的な DNA 依存的合成を防ぎ、RNA 依存的合成を可能にしてストランド特異性を高めます。

消耗品

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

! 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、jp.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 |
|-----------|---------------|------------------------------------|
| 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 | 必要な時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。 |
| SMM | -25°C ~ -15°C | 氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心します。 |
| 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。 |

2. サーマルサイクラーに次の FSS 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、100°C に設定
- 反応量を 25 μ L に設定
- 25°C で 10 分間
- 42°C で 15 分間
- 70°C で 15 分間
- 4°C で保持

手順

- 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、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- First Strand Synthesis Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
- シールされた PCR プレート を 280 \times g で 10 秒間遠心します。
- 各ウェルに First Strand Synthesis Master Mix を 8 μ L ずつ添加します。
- ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
- 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、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、各ウェルの総液量は 25 μ L です。

2nd strand 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。デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) の代わりにデオキシウリジン三リン酸 (dUTP) を組み込むことによって、増幅中の 2nd strand の合成を止め、ストランド特異性を獲得させます。

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 (セミスカート付き)
- Microseal 'B' シーリングフィルム

事前準備

- 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。
- サーマルサイクラーに次の SSS 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、40°C に設定
 - 反応量を 50 μ L に設定
 - 16°C で 1 時間
 - 4°C で最長 16 時間保持

手順

cDNA の生成

1. シールされた PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに SMM を 25 μL 添加します。
3. ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
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、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、各ウェルの総液量は 50 μL です。

cDNA のクリーンアップ

1. シールされた PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
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. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心します。
 - ピペティングを 10 回行い、その後、シールします。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
7. 上清 130 μL を取り除き、廃棄します。
8. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製した 80% EtOH を 175 μL 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。
9. **2 回目**のビーズ洗浄を行います。
10. 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
11. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
12. 磁気スタンドからプレートを下ろします。
13. 各ウェルに RSB を 19.5 μL 添加します。
14. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールし、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - 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、シールします。
15. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、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、シールします。
16. 室温で 2 分間インキュベートします。
17. 280 × g で 10 秒間遠心します。
18. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
19. 新しい PCR プレートの、対応する各ウェルに、上清 17.5 μL を移します。少量のビーズのキャリーオーバーがあっても性能には影響ありません。

セーフストップポイント

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）。

3' 末端のアデニル化

このステップでは、平滑断片の 3' 末端にアデニン（A）ヌクレオチドを付加し、アダプターライゲーション時に 3' 末端同士が結合しないようにします。アダプターの 3' 末端上の、対応するチミン（T）ヌクレオチドが相補的なオーバーハングとなり、アダプターが断片に結合します。

消耗品

- ATL4 (A-Tailing Mix)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ アンカープレート (RNA Index Anchor Plate)
 - ▶ STL (Stop Ligation Buffer)

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 |
|----------|-----------|--------------------------------|
| アンカープレート | -25℃～-15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |
| ATL4 | -25℃～-15℃ | 室温で融解します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。 |
| STL | -25℃～-15℃ | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。 |

2. サーマルサイクラーに次の ATAIL 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、100℃に設定
- 反応量を 30 µL に設定
- 37℃で 30 分間
- 70℃で 5 分間
- 4℃で保持

手順

1. セーフストップポイントでの中断後にプロトコールを再開する場合は、シールされた PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに ATL4 を 12.5 µL 添加します。
3. 200 µL ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後、シールします。
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、ATAIL プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 38 分程で、各ウェルの総液量は 30 µL です。

アンカーのライゲーション

このステップでは、プレインデックスアンカーを二本鎖 cDNA 断片の末端に結合し、デュアルインデックス化に備えます。その後の PCR 増幅ステップで、インデックスアダプター配列を付加します。

消耗品

- LIGX (Ligation Mix)
- STL (Stop Ligation Buffer)
- RNA インデックスアンカープレート (RNA Index Anchor Plate)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
 - ▶ Agencourt AMPure XP

試薬について

- LIGX は、 -25°C ～ -15°C で保存しても液体のままですので、融解は不要です。
- アンカープレートの各ウェルは使い切りで、RNA Index Anchor Plate を含有します。アンカープレートの各ウェルの総液量は同じで、順不同で使用できます。
- アンカープレートは、後のステップで使用するインデックスプレートと区別できるようになっています。プレートのラベルを確認し、プレートが間違っていないか確認してください。

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 |
|-----------|---|------------------------------------|
| 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。 |
| LIGX | -25°C ～ -15°C | 必要な時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。 |
| 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。 |

2. サーマルサイクラーに次の LIG 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、 100°C に設定
 - 反応量を $38\ \mu\text{L}$ に設定
 - 30°C で 10 分間
 - 4°C で保持

手順

アンカーの付加

1. シールされた PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 以下の分量を、記載順に、各ウェルに添加します。

| 添加順序 | 試薬 | サンプルインプット量が 100 ng 以下の場合 (μL) | サンプルインプット量が 100 ng 超の場合 (μL) |
|------|------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | RSB | 2.5 | 0 |
| 2 | RNA Index Anchor Plate | 2.5 | 5 |
| 3 | LIGX | 2.5 | 2.5 |

3. 200 μL ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後、シールします。
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、LIG プログラムを実行します。
プログラムの所要時間は計 13 分程で、各ウェルの総液量は 38 μL です。

ライゲーションの停止

1. シールされた PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに STL を 5 μL 添加します。
3. ピペッティングを 15 回行って混合します。
各ウェルの総液量は 43 μL です。

断片のクリーンアップ

このステップでは、磁気ビーズを用いて、アダプター結合後の断片を精製します。

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' シーリングフィルム

手順

1. AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
2. 各ウェルに AMPure XP を 34 μL 添加します。
3. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 \times g で 10 秒間遠心します。
 - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
4. 室温で 5 分間インキュベートします。
5. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
6. 上清 67 μL を取り除き、廃棄します。
7. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製した 80% EtOH を 175 μL 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。
8. **2 回目**のビーズ洗浄を行います。
9. 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します
10. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
11. 磁気スタンドからプレートを下ろします。
12. 各ウェルに RSB を 22 μL 添加します。
13. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールし、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - 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、シールします。
14. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、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、シールします。
15. 室温で 2 分間インキュベートします。
16. 280 \times g で 10 秒間遠心します。
17. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
18. 新しい PCR プレートの、対応する各ウェルに、上清 20 μL を移します。増幅 PCR サイクル数は、サンプルのインプット量や品質によって異なります。複数のサンプルを調製する場合は、[18 ページの「ライブラリーの増幅」](#) 手順に記載されている PCR サイクル数に従って、別々のプレートに移してください。

セーフストップポイント

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）。

ライブラリーの増幅

この PCR のステップでは、アンカーを結合させた DNA 断片を選択的に増幅し、インデックスと、クラスター形成のためのプライマー配列を付加します。その結果、デュアルインデックスライブラリー、すなわち両末端にアダプターが付加された DNA 断片ができます。

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

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- インデックスアダプタープレート (UDP0XXX)

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使い切りで、UDP0XXX (10 µL 超) を含有します。UDP0XXX 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 |
|-----------------|---------------|---|
| EPM | -25°C ~ -15°C | 室温で融解します。転倒混和し、短時間遠心します。 |
| インデックスアダプタープレート | -25°C ~ -15°C | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、1,000 × g で 1 分間遠心します。 |

2. 下の表に記載されている適切な PCR サイクル数を用いて、以下の 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
 - 反応量を 50 µL に設定
 - 98°C で 30 秒間
 - サイクル数 X：
 - 98°C で 10 秒間
 - 60°C で 30 秒間
 - 72°C で 30 秒間
 - 72°C で 5 分間
 - 4°C で最長 16 時間保持

プログラムを調整して、異なるインプットの品質および量に対して最適化します。複数のサンプルを1枚のプレートで増幅する場合は、それぞれのサンプルのインプット量が同じになるようにしてください。

| インプット量 (ng) | PCR サイクル数 (X) ¹ |
|----------------------------------|----------------------------|
| Ribo-Plus | |
| 1 | 15 |
| 10 | 15 |
| 1000 | 10 |
| Ribo-Zero Plus Microbiome | |
| 25 | 17 |
| 50 | 16 |
| 100 | 15 |

¹ FFPE や細菌分離株の場合は2 サイクル追加してください。

プログラムの所要時間は、15 サイクルで計 44 分程、13 サイクルで計 39 分程、10 サイクルで計 33 分程です。

手順

- セーフ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、シールされた PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心します。
- 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。
- 以下の分量を記載順に、PCR プレートの各ウェルに添加します。
 - UDPOXXX (10 µL)
 - EPM (20 µL)
- ピペティングを 10 回行って混合し、その後、シールします。
- 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、PCR プログラムを実行します。各ウェルの総液量は 50 µL です。

セーフストップポイント

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)。

ライブラリーのクリーンアップ

このステップでは、磁気ビーズを用いてデュアルインデックス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% EtOH
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- Microseal 'B' シーリングフィルム

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°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。 |

手順

1. シールされた PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心します。
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 50 μL 添加します。
4. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心します。
 - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
7. 上清 90 μL を取り除き、廃棄します。

8. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製した 80% EtOH を 175 μ L 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。
9. **2回目**のビーズ洗浄を行います。
10. 20 μ L ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
11. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
12. 磁気スタンドから外します。
13. 各ウェルに RSB を 17 μ L 添加します。
14. 次のいずれかの方法で混合します。
 - シールし、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後、シールします。
15. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後、シールします。
16. 室温で 2 分間インキュベートします。
17. 280 \times g で 10 秒間遠心します。
18. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
19. 新しい PCR プレートの、対応するウェルに上清 15 μ L を移します。

セーフストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、25°C ~ 15°C で保存してください（最長 30 日間）。

ライブラリーのチェック

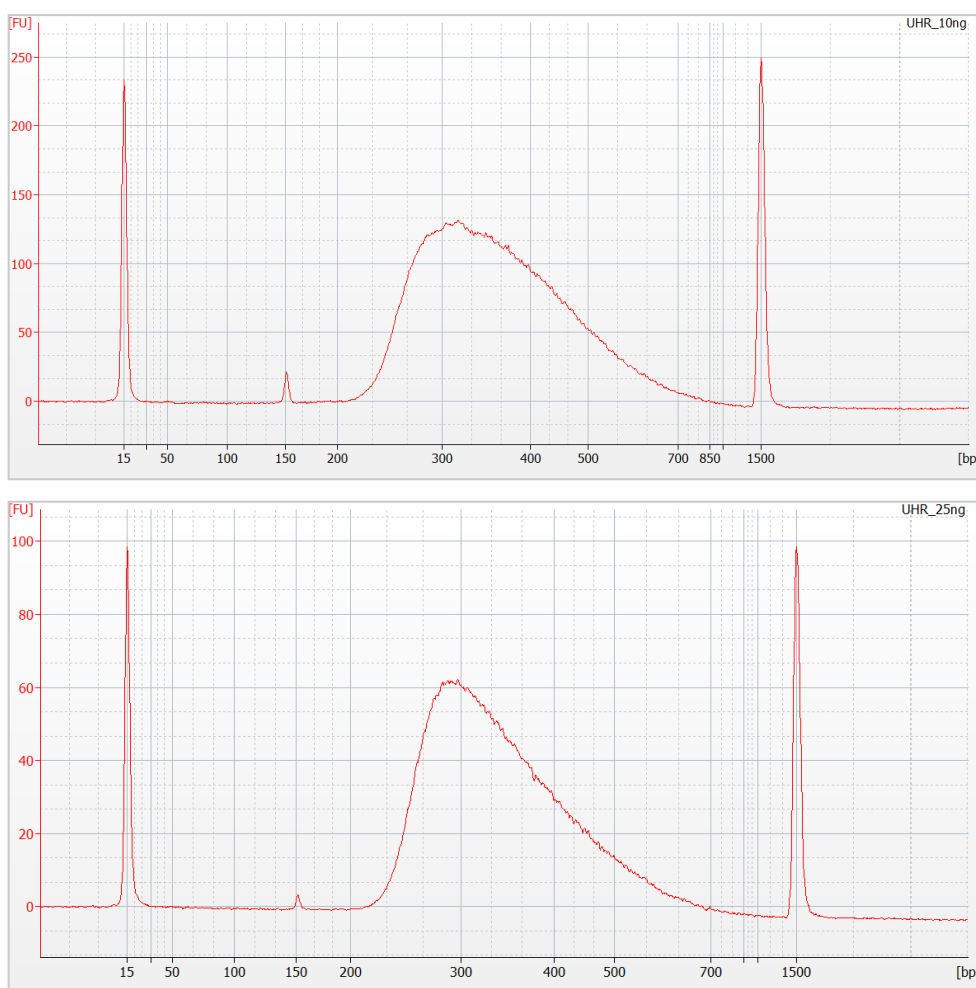
このステップでは、最終ライブラリーの濃度と品質をチェックします。

1. 次のいずれかの方法を用いてライブラリーを解析します。

- NextSeq 1000/2000 システムを用いる場合は、1 μ L のライブラリーを 1:10,000 に希釈し、KAPA qPCR Library Quantification Kit を用いてライブラリーを解析します。
- その他のシーケンスシステムを用いる場合は、Agilent 2100 Bioanalyzer と DNA 1000 Kit を用いて 1 μ L のライブラリーを解析します。

下の図は、インプット量 10 ng の Universal Human Reference (UHR) RNA と 100 ng の UHR から調製した最終ライブラリーのトレース見本です。

図 2 Bioanalyzer によるトレースの見本（上図はインプット量 10 ng、下図は 100 ng）



2. [オプション] さらなる定量のために、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて、ライブラリー 2 μ L の解析を行います。インタクトな RNA サンプルの場合、平均断片長は約 375 ~ 475 bp、想定されるインサートサイズは約 190 bp です。

ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップでは、NovaSeq 6000、NextSeq 500、NextSeq 550、NextSeq 1000 または NextSeq 2000 システムでの開始濃度にライブラリーを希釈します。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シーケンスを推奨します。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 から求めた平均サイズと、Qubit から求めた濃度を使用します。

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

- KAPA Library Quantification qPCR 法で定量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、ライブラリーインサートサイズの平均値を 300 ~ 400 bp とします。
- 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 | 1 | 1 |
| NextSeq 1000/NextSeq 2000 | 2 | 750 |
| NovaSeq 6000 | 0.5 | 100 |

- 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。新しいチューブに希釈後のライブラリーを 10 μL ずつ混合し、ライブラリープールとします。
- 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。


NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2 以降を用いる場合かつダークサイクルシーケンスを行わない場合（各インサートリードの 1 サイクル目にイメージングなしで別の推奨シーケンスレシピを用いる場合）は、必ず T-オーバーハングをトリミングし、5% 以上の PhiX を含めてください。ダークサイクルシーケンスの詳細については、『**NextSeq 1000/2000 Sequencing System Guide**』（文書番号：1000000109376）を参照してください。

T- オーバーハングのトリミング (オプション)

このステップでは、1 サイクル目のヌクレオチドを FASTQ 生成モードでトリミングし、T- オーバーハングを除去します。

Illumina Stranded Total RNA Prep では、cDNA インサートに T ヌクレオチドが付加されることによって、cDNA インサートがアダプターに結合できるようになります。T ヌクレオチドを付加すると、各インサートリードの 1 サイクル目における塩基多様性が低下し、シーケンス 1 サイクル目のベースコールが不正確になります。解析の品質を高めるため、1 サイクル目のヌクレオチドをトリミングすることを推奨します。

1. BaseSpace Sequence Hub 上で FASTQ Toolkit アプリケーションを使用してトリミングを行うには、以下の操作を行ってください。
 - a. ベーストリミングの設定画面を展開します。
 - b. [Trim reads at the 5'end by n positions] 欄に「1」と入力します。
2. サンプルシートを使用してトリミングを行うには、サンプルシートファイルに次の設定を追加します。
 - Read1StartFromCycle,2
 - Read2StartFromCycle,2

 FASTQ 生成モードは、ラン当たり 1 つの設定にのみ対応しています。ご使用になるライブラリーについて確実に設定するため、T- オーバーハングを持たないライブラリーのデマルチプレックスには別のサンプルシートを使ってください。

サポート情報

はじめに

本ガイドに記載されているプロトコールは、お客様がこの付録の内容に目を通し、キットの内容を確認し、必要な消耗品および機器をすべて入手していることを前提としています。

略語

| 略語 | 定義 |
|-------|--------------------------------|
| A | Adenine |
| ATL4 | A-Tailing Mix |
| cDNA | Complementary DNA |
| DB1 | Depletion Probe Buffer |
| DP1 | Depletion Probe Pool |
| DPM | Microbiome Depletion Probe |
| dsDNA | Double-stranded DNA |
| dTTP | Deoxythymidine triphosphate |
| dUTP | Deoxyuridine triphosphate |
| ELB | Elution Buffer |
| EPH3 | Elute, Prime, Fragment 3HC Mix |
| EPM | Enhanced Primer Mix |
| EtOH | Ethanol |
| FSA | First Strand Synthesis Mix |
| LIGX | Ligation Mix |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PRB | Probe Removal Buffer |
| PRE | Probe Removal Enzyme |
| RDB | RNA Depletion Buffer |
| RDE | RNA Depletion Enzyme |

| 略語 | 定義 |
|------|---------------------------|
| RIN | RNA Integrity Number |
| rRNA | Ribosomal RNA |
| RSB | Resuspension Buffer |
| RVT | Reverse Transcriptase |
| SMM | Second Strand Master Mix |
| STL | Stop Ligation Buffer |
| T | Thymine |
| UD | Unique dual |
| UHR | Universal Human Reference |

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 Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus キット一式と、IDT for Illumina RNA UD Indexes、1 セット以上が必要です。4 セットすべて組み合わせると、最大 384 のライブラリーのインデックス化が可能です。

| コンポーネント | 製品名 | 当社カタログ番号 |
|----------|--|----------|
| ライブラリー調製 | Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 Samples) | 20040525 |
| | Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Samples) | 20040529 |
| | Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 Samples) | 20072063 |
| インデックス | IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) | 20040553 |
| | IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) | 20040554 |
| | IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 Samples) | 20040555 |
| | IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) | 20040556 |

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除去用試薬、cDNA 合成用試薬、ライブラリー調製用試薬が含まれています。アンカーセットには、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 (i5) アダプター、ならびにライゲーションに必要な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 RNAClean XP および Agencourt AMPure XP は含まれていません。サプライヤーについては、[31 ページの「消耗品および機器」](#)をご覧ください。

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 Samples) (20040525)

*Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit は単品でもご購入いただけます。

Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|-----|------------------------|------|------------|------------|
| 1 | DB1 | Depletion Probe Buffer | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | DP1 | Depletion Probe Pool | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | ELB | Elution Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRB | Probe Removal Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRE | Probe Removal Enzyme | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDB | RNA Depletion Buffer | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDE | RNA Depletion Enzyme | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina cDNA Synthesis

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|-------------------------------------|------|------------|------------|
| 1 | EPH3 | Elute, Prime, Fragment 3HC Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | FSA | First Strand Synthesis Mix | 琥珀色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RSB | Resuspension Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RVT | Reverse Transcriptase | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | SMM | Second Strand Marking Master Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina RNA Prep, Ligation

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|----------------------|------|------------|------------|
| 1 | ATL4 | A-Tailing Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | EPM | Enhanced PCR Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | LIGX | Ligation Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RSB | Resuspension Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | STL | Stop Ligation Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Samples) (20040529)

*Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit は単品でもご購入いただけます。

Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|-----|------------------------|------|------------|------------|
| 1 | DB1 | Depletion Probe Buffer | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | DP1 | Depletion Probe Pool | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | ELB | Elution Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRB | Probe Removal Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRE | Probe Removal Enzyme | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDB | RNA Depletion Buffer | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDE | RNA Depletion Enzyme | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina cDNA Synthesis

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|-------------------------------------|------|------------|------------|
| 4 | EPH3 | Elute, Prime, Fragment 3HC Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | FSA | First Strand Synthesis 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 RNA Prep, Ligation

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップの色 | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|----------------------|--------|------------|------------|
| 4 | ATL4 | A-Tailing Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | EPM | Enhanced PCR Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | LIGX | Ligation Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | RSB | Resuspension Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | STL | Stop Ligation Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 Samples) (20072063)

*Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit は単品でもご購入いただけます。

Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|-----|---------------------------------|------|------------|------------|
| 1 | DB1 | Depletion Probe Buffer | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | DP1 | Depletion Probe Pool | 青色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | DPM | Microbiome Depletion Probe Pool | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | ELB | Elution Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRB | Probe Removal Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | PRE | Probe Removal Enzyme | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDB | RNA Depletion Buffer | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 1 | RDE | RNA Depletion Enzyme | 黄色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

Illumina cDNA Synthesis

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|-------------------------------------|------|------------|------------|
| 4 | EPH3 | Elute, Prime, Fragment 3HC Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | FSA | First Strand Synthesis 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 RNA Prep, Ligation

| 数量 | 試薬 | 説明 | キャップ | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|------|----------------------|------|------------|------------|
| 4 | ATL4 | A-Tailing Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | EPM | Enhanced PCR Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | LIGX | Ligation Mix | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | RSB | Resuspension Buffer | 透明 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |
| 4 | STL | Stop Ligation Buffer | 赤色 | -25℃～ -15℃ | -25℃～ -15℃ |

IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040553)

| 数量 | 説明 | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|--|--------------|--------------|
| 1 | IDT for Illumina RNA Index Anchors | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |
| 1 | IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A (UDP0001–UDP0096) | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |

IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040554)

| 数量 | 説明 | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|--|--------------|--------------|
| 1 | IDT for Illumina RNA Index Anchors | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |
| 1 | IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B (UDP0097–UDP0192) | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |

IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (2004555)

| 数量 | 説明 | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|--|--------------|--------------|
| 1 | IDT for Illumina RNA Index Anchors | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |
| 1 | IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C (UDP0193–UDP0288) | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |

IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040556)

| 数量 | 説明 | 出荷時条件 | 保管条件 |
|----|--|--------------|--------------|
| 1 | IDT for Illumina RNA Index Anchors | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |
| 1 | IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D (UDP0289–UDP0384) | -25°C～ -15°C | -25°C～ -15°C |

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。これら以外の消耗品および機器を使用した場合には、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 (RNase フリー) | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 20 µL フィルター付きピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 µL フィルター付きピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 1000 µL フィルター付きピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 96 ウェル twin.tec 250 µL PCR プレート (セミスカート付き) | 以下のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> フィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：E951020303 VWR、カタログ番号：47744-106 |
| Agencourt AMPureXP (60 mL) | ベックマン・コールター、カタログ番号：A63881 |
| Agencourt RNAClean XP (40 mL) | ベックマン・コールター、カタログ番号：A63987 |
| Agilent DNA 1000 Kit | アジレント・テクノロジー、カタログ番号：5067-1504 |
| 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 |
| 無水エタノール (500 mL) | シグマ アルドリッチ、カタログ番号：E7023 |
| Microseal 'B' シーリングフィルム | バイオ・ラッド、カタログ番号：MSB-1001 |
| 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 |
| 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 |
| RNaseZap ¹ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| [オプション] 以下のポジティブコントロールサンプルのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> Human Peripheral Blood Leukocyte Universal Human Reference RNA Universal RNA – Mouse Normal Tissues Universal RNA – Rat Normal Tissues E. coli Total RNA | 以下のサプライヤーのいずれか (コントロールサンプルによって異なります) <ul style="list-style-type: none"> BioChain、カタログ番号：R1234148 アジレント・テクノロジー、カタログ番号：740000 BioChain、カタログ番号：R4334566 BioChain、カタログ番号：R4334567 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：AM7940 |
| [オプション] Agilent RNA 6000 Pico Kit | アジレント・テクノロジー、カタログ番号：Q32856 |
| [オプション] 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 |
| [オプション] 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 |

| 消耗品 | サプライヤー |
|---|---|
| [オプション] KAPA Library Quantification Kit | コンプリートキット（ユニバーサル）カタログ番号：07960140001 または KAPA Library Quantification Kit - qPCR MasterMix（ユニバーサル）および Primer Premix のみ カタログ番号：07960441001 サプライヤー =Roche KAPA Kit：KK4824 |
| [オプション] qPCR 装置 | |
| ¹ 表面汚染除去用 | |

機器

| 機器 | 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 マルチチャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 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 |
| 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 |
| 2100 バイオアナライザ電気泳動システム | アジレント・テクノロジー、カタログ番号：G2939BA |
| [攪拌ワークフロー] ハイスピードシェーカー BioShake iQ | Q Instruments、カタログ番号：1808-0506 |
| [攪拌ワークフロー] BioShake PCR プレートアダプター | Q Instruments、カタログ番号：1808-1041 |
| 以下の磁気製品のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> • [攪拌ワークフロー] DynaMag-96 Side Magnet • [ピペットワークフロー] Magnetic Stand-96 | 該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> • サーマフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：12331D • サーマ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 |
| 以下の 96 ウェルサーマルサイクラーのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> • Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler • T100 Thermal Cycler | 該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> • バイオ・ラッド、カタログ番号：1851196 • バイオ・ラッド、カタログ番号：1861096EDU |
| ボルテックスミキサー | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| [オプション] Qubit Fluorometer | 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：Q32866 など |

テクニカルサポート

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

ウェブサイト: jp.illumina.com

メールアドレス: 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 | 国外 |
|----------|-------------------|------------------|
| 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 | 国外 |
|---------|-------------------|-------------------|
| 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) —当社のウェブサイト (jp.support.illumina.com/sds.html) から入手できます。

製品マニュアル—jp.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
jp.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。

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®