

TruSight Oncology 500

Reference Guide



文書番号 : 1000000067621 v06 JPN

2020年11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。

ILLUMINA PROPRIETARY

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.

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	日付	変更内容
文書番号 1000000067621 v06	2020年9月	ライブラリー調製自動化キットと、サードパーティ製自動液体分注システムとともに使用できる自動化形式についての情報を追加。
文書番号 1000000067621 v05	2020年4月	確実に懸濁させるための、LNB1の混合についての操作説明を更新。「cDNAのクリーンアップ」セクションの攪拌速度を1,500 rpmから1,800 rpmに修正。
文書番号 1000000067621 v04	2019年11月	シーケンスランごとのライブラリー数および可能となるDNA/RNAの組み合わせについてのガイドラインは、『NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号15048776）を参照するように記載。
文書番号 1000000067621 v03	2019年10月	RNA単独のワークフローを追加。 アッセイによって検出されるバイオマーカーの1つとして、遺伝子増幅を追加。 RNA最大インプット量についてのガイダンスを削除。これに伴い、プロトコールにおいて推奨されるRNA希釈濃度も削除。 キットには最低限40 ngのDNA/RNAインプットが必要であり、インプット量が40 ngを下回るとライブラリーの収量および品質が低下する可能性があることを記載。 gDNAを断片化するための調製では、40 ng以上のDNAを使用できるため、TEB中のサンプル濃度の記載を削除。 キットの内容リストにPierianDx搭載キットを追加。 Covaris消耗品および機器を追加。 Covaris ME220機器の設定を追加。 クロスコンタミネーションを回避し、プレートをシールするための新たなヒントおよびテクニックを追加。 シーケンスランごとのライブラリー数および可能となるDNA/RNAの組み合わせについてのガイドラインは、TruSight Oncology 500 サポートページを参照するように記載。 適切に懸濁させるための、LNB1 ビーズペレットの混合についての操作説明を追加。 ビーズを懸濁するために1分間ボルテックスするステップを「結合」セクションに追加し、この手順説明を概要および調製情報からは削除。 TruSight Oncology 500 ライブラリーの定量に有効なAccuClear 定量キットについての情報を追加。 ライブラリーの定量に関する補足的なガイドラインを追加。RSBをブランクとして使用する、希釈したAccuClear DNAスタンダードとブランクをトリプレケートで実施する、ライブラリーを単一レプリケートで実施する、など。
文書番号 1000000067621 v02	2019年6月	略語のリストを更新。
文書番号 1000000067621 v01	2019年3月	RNA由来のサンプルライブラリーに対するステップをプロトコールに追加。 RNAに対するキット内容、消耗品、および機器を追加。
文書番号 1000000067621 v00	2018年12月	初版リリース。

目次

第1章 概要	1
はじめに	1
DNA/RNA インプットの推奨事項	1
サンプルの品質評価	1
標準サンプル（オプション）	2
DNA 断片化の推奨事項	2
ライブラリー調製の自動化（オプション）	2
追加リソース	2
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	3
DNA 単独のライブラリー調製ワークフロー	6
DNA 単独の濃縮ワークフロー	7
DNA および RNA のライブラリー調製ワークフロー	8
DNA および RNA の濃縮ワークフロー	9
RNA 単独のライブラリー調製ワークフロー	10
RNA 単独の濃縮ワークフロー	11
RNA の変性とアニール	12
第1鎖 cDNA の合成	13
第2鎖 cDNA の合成	14
cDNA のクリーンアップ	14
gDNA の断片化	16
末端平滑化および A-Tailing の実施	17
アダプターのライゲート	19
ライゲーションのクリーンアップ	20
インデックス PCR	21
1 回目のハイブリダイゼーションセットアップ	23
ターゲットのキャプチャー 1 回目	24
2 回目のハイブリダイゼーションセットアップ	26
ターゲットのキャプチャー 2 回目	27
濃縮ライブラリーの増幅	29
増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ	30
ライブラリーの定量（オプション）	32
ライブラリーのノーマライズ	32
ライブラリーのプーリングおよびローディング濃度への希釈	34

付録 A	サポート情報	35
はじめに		35
キット内容		35
消耗品および機器		38
略語		40
テクニカルサポート		41

第1章 概要

はじめに	1
DNA/RNA インプットの推奨事項	1
サンプルの品質評価	1
標準サンプル (オプション)	2
DNA 断片化の推奨事項	2
ライブラリー調製の自動化 (オプション)	2
追加リソース	2

はじめに

TruSight™ Oncology 500 プロトコールでは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体から抽出した DNA および RNA を、Illumina® シーケンスシステムでシーケンス可能ながん関連遺伝子用の濃縮ライブラリーに変換するための、濃縮に基づくアプローチについて説明します。TruSight Oncology 500 は、DNA と RNA から 48 ライブラリー調製することができ、DNA と RNA のライブラリーを組み合わせることも可能です。

このキットは、523 遺伝子における低頻度の体細胞バリエーションを高い感度と特異性で検出できるように最適化されています。以下のような DNA バイオマーカーを検出できます。

- ▶ 1 塩基変異 (SNV : Single Nucleotide Variant)
- ▶ 挿入
- ▶ 欠失
- ▶ コピー数バリエーション (CNV : Copy Number Variant)
- ▶ 複数塩基変異 (MNV : MultiNucleotide Variant)

TruSight Oncology 500 は、免疫療法バイオマーカーとして、DNA 中の腫瘍変異負荷 (TMB : Tumor Mutational Burden) およびマイクロサテライト不安定性 (MSI : MicroSatellite Instability) も検出します。融合遺伝子およびスプライスバリエーションは RNA で検出されます。

DNA/RNA インプットの推奨事項

TruSight Oncology 500 Kit アッセイには、最小 40 ng の DNA/RNA インプットを使用します。インプット量が 40 ng 未満だと、ライブラリーの収量および品質が低下する可能性があります。プロトコールを開始する前にインプットの核酸の定量を行ってください。十分な核酸物質を得るには、2 mm³ 以上の FFPE 組織から核酸を分離します。

- ▶ 高回収量が得られ、サンプル消費を最低限に抑え、サンプルの完全性を維持できる核酸抽出手法を用いてください。QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を使用すると、高収量の核酸を回収できます。
- ▶ AccuClear™ (DNA) や QuantiFluor® (RNA) など、DNA/RNA に結合する蛍光色素を用いた蛍光定量法を用いてください。

サンプルの品質評価

性能を最適化するには、TruSight Oncology 500 アッセイを用いる前に DNA および RNA サンプルの品質を評価してください。

- ▶ DNA サンプルは Illumina FFPE QC Kit で評価することができます。
- ▶ delta Cq 値が 5 以下となる DNA サンプルを使用してください。delta Cq 値が 5 を超えるサンプルを使用すると、アッセイ性能が低下する場合があります。
- ▶ RNA サンプルは、Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer™ (Standard Sensitivity RNA Analysis Kit) または Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit) を用いて評価することができます。
- ▶ DV₂₀₀ 値が 20% 以上になる RNA サンプルを用いてください。DV₂₀₀ 値が 20% 未満のサンプルを使用すると、アッセイ性能が低下する場合があります。

標準サンプル（オプション）

- ▶ Horizon Discovery HD753（DNA）や Agilent Universal Human Reference RNA のような、既知のバリエーション組成のあるリファレンス物質を用いてください。Agilent Universal Human Reference RNA は Intact RNA サンプルです。12 ページの「RNA の変性とアニール」で説明されている Intact RNA の手順を行った後、サンプルを処理します。
- ▶ RNase/DNase フリー水はテンプレートなしのコントロールとして使用してください。
- ▶ 標準サンプルまたはテンプレートなしのコントロールを処理すると、処理可能なテストサンプルの数がその分少なくなります。

DNA 断片化の推奨事項

TruSight Oncology 500 アッセイは、90 ~ 250 bp に断片化された gDNA からライブラリー調製を行うように最適化されています。このアッセイは、Covaris E220evolution™、LE220 または ME220 Focused-ultrasonicator のいずれかを、16 ページの「gDNA の断片化」に記載されているパラメーターで使用することで最適化されます。断片サイズの分布は、サンプル品質や、断片化で用いられる超音波破碎装置により異なる場合があります。

断片化には以下のガイドラインを使用してください。

- ▶ シェアリングチューブ中に過度の気泡やエアギャップがあると、せん断が不完全になる可能性があります。
 - ▶ gDNA サンプルは、気泡ができないようゆっくりと Covaris チューブにロードします。
 - ▶ Covaris チューブを遠心してチューブの底にサンプルを集めた後、せん断します。
- ▶ LE220 Covaris 装置を用いる場合は、未使用の Covaris 8 microTUBE Strip ウェルに水を 52 µL 入れることで性能を最適化できます。
- ▶ **（オプション）** せん断されたサンプルの断片サイズ分布は、Agilent Bioanalyzer 2100 で Agilent DNA 1000 Kit を用いて評価します。

ライブラリー調製の自動化（オプション）

TruSight Oncology 500 Kit では、サードパーティ製自動液体分注システムとともに使用できる自動化対応キットも用意されています。目的に適したタイプの TruSight Oncology 500 Kit を確認するには、35 ページの「サポート情報」を参照してください。ライブラリー調製を自動化するメソッドは、サードパーティ製自動液体分注システムのベンダーから提供されます。TruSight Oncology 500 のライブラリー調製自動化メソッドの詳細については、ベンダー各社にお問い合わせください。

追加リソース

ソフトウェア、トレーニングリソース、製品の互換性に関する情報、および以下の文書については、イルミナウェブサイトの [TruSight Oncology 500 サポートページ](#) にアクセスしてください。常に最新バージョンのサポートページをご確認ください。

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	3
DNA 単独のライブラリー調製ワークフロー	6
DNA 単独の濃縮ワークフロー	7
DNA および RNA のライブラリー調製ワークフロー	8
DNA および RNA の濃縮ワークフロー	9
RNA 単独のライブラリー調製ワークフロー	10
RNA 単独の濃縮ワークフロー	11
RNA の変性とアニール	12
第1鎖 cDNA の合成	13
第2鎖 cDNA の合成	14
cDNA のクリーンアップ	14
gDNA の断片化	16
末端平滑化および A-Tailing の実施	17
アダプターのライゲート	19
ライゲーションのクリーンアップ	20
インデックス PCR	21
1 回目のハイブリダイゼーションセットアップ	23
ターゲットのキャプチャー 1 回目	24
2 回目のハイブリダイゼーションセットアップ	26
ターゲットのキャプチャー 2 回目	27
濃縮ライブラリーの増幅	29
増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ	30
ライブラリーの定量 (オプション)	32
ライブラリーのノーマライズ	32
ライブラリーのプーリングおよびローディング濃度への希釈	34

はじめに

本セクションは TruSight Oncology 500 Kit プロトコールについて記載しています。

- ▶ 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、製品の互換性および実験パラメーターを確認してください。
- ▶ 先に進む前に、キットの内容を把握し、必要な消耗品および装置が揃っていることを確認します。詳細については、35 ページの「キット内容」を参照してください。
- ▶ 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。
- ▶ シーケンスランごとのライブラリー数、および可能となる DNA/RNA の組み合わせについてのガイドラインは、『NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号 15048776）を参照してください。
- ▶ ライブラリー調製の開始前に、サンプル濃度およびサンプルの品質情報を記録します。この情報は、後でデータ解析中に使用するため保存しておいてください。

ヒントおよびテクニック

プロトコールを開始する前に、ヒントおよびテクニックを確認します。

- ▶ 多くの重要なテクニックはこのセクションにのみ記載されており、プロトコール内で繰り返されていないため、ヒントおよびテクニックはプロトコールを開始する前に確認しておいてください。
- ▶ 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。
- ▶ プロトコールに安全なストップポイントが指定されていない場合は、ただちに次のステップに進みます。

クロスコンタミネーションの防止

- ▶ 増幅前エリアから増幅後エリアに移動する場合には、一方向のワークフローを用いてください。
- ▶ 増幅産物やプローブのキャリーオーバーを防ぐには、増幅後エリアで作業を開始した後に増幅前エリアに戻らないようにしてください。
- ▶ 手順の実行前と実行後は、RNase/DNase 除去クリーナーを使用して、作業面や機器を完全に洗浄してください。
- ▶ サンプルへの添加、または、サンプルを別ウェルに移送する場合、ウェルごとにチップを交換してください。
- ▶ インデックスプライマーは一度に1つずつ開けて取り扱います。各インデックスチューブは使用後すぐに、キャップを閉め直してください。キットには、予備のキャップが付属しています。
- ▶ インデックスプライマーを添加する場合、ウェルごとにチップを交換してください。
- ▶ 作業台から未使用のインデックスプライマーチューブを取り除いてください。
- ▶ 手袋がインデックスプライマー、サンプル、またはプローブに接触した場合、手袋を交換してください。

プレートのシーリング

- ▶ プロトコルの以下のステップの実行前に、プレートは適切なプレートシールで必ずシールしてください。
 - ▶ 攪拌ステップ
 - ▶ ボルテックスステップ
 - ▶ 遠心ステップ
 - ▶ サーマルサイクルステップ
- ▶ 粘着シールでプレートをカバーし、ゴム製ローラーでプレートとシールを圧着させてください。
- ▶ プレートのカバーには毎回新しいシールを使用してください。
- ▶ Microseal 'B' 粘着シールは -40°C ~ 110°C で効果があり、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。Microseal 'B' は攪拌、遠心分離、PCR 増幅、および長期保管の際に使用します。
- ▶ シールしたプレート内部に水滴の付着が見られる場合は、280 × g で 1 分間遠心します。

プレートの移送

- ▶ プレート間で溶液を移す場合、指定された容量をプレートの各ウェルから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

- ▶ プレートを遠心するよう指示された場合は、280 × g で 1 分間遠心してください。

試薬の取り扱い

- ▶ 蒸発を制限し、汚染を防ぐためには、使用直後に試薬チューブすべての蓋をしっかり締めてください。
- ▶ 手順で不要になった試薬は、推奨保管条件下に戻してください。
- ▶ TruSight Oncology 500 Kit の安定性は検証されており、本キットの使用性能は最大 8 回まで証明されています。
- ▶ マスターミックスの調製表には、サンプルごとに十分な量を確保できるように、多めの量が記載されています。

ビーズの取り扱い

- ▶ ビーズをピペットで混合する際は、以下の点に注意してください。
 - ▶ 混合する容量に適したピペットとチップサイズを使用します（例：20～200 µL の容量には P200 を使用します）。
 - ▶ サンプル容量の約 50～75% にピペットの容量設定を調節します。
 - ▶ ピペット操作はゆっくりと、滑らかに行います。
 - ▶ 激しいピペッティング、跳ね返りや泡を生じさせる操作は行わないでください。
 - ▶ ペレットの上にピペットチップが来るようにし、ウェルまたはチューブからペレットを直接吸い上げ、ビーズを押し出します。
 - ▶ ビーズペレットが完全に溶液中にあることを確認します（例：SMB ペレットでは、溶液が暗褐色に見え、濃度が均一になっているはずです）。
- ▶ 使用前にビーズが室温であることを確認してください。
- ▶ 使用前に 1 分間ビーズを混合し、必ず均一になっているようにします。
- ▶ 磁気分離ステップ中にピペットチップにビーズを吸引した場合、磁気スタンドのプレート上の元の同じウェルに戻します。液体が透明になるまで待ちます（約 2 分）。
- ▶ ビーズを洗浄する際は、以下の点に注意してください。
 - ▶ 適切な磁気スタンドをプレートに使用します。
 - ▶ ビーズペレットに直接液体を分注して、ウェルの側面にあるビーズを湿らせるようにします。
 - ▶ 磁気スタンド上のプレートは、取り外すよう指示されるまでそのままにします。
 - ▶ 磁気スタンドにプレートがある間は攪拌しません。ビーズペレットを動かさないでください。

DNA 単独のライブラリー調製ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて DNA のみのライブラリー調製を行う推奨ワークフローを示しています。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、DNA 8 サンプルを想定しています。Covaris 超音波破碎装置の脱気時間も含まれます。

図 1 TruSight Oncology 500 Kit の DNA 単独ワークフロー（パート 1）



DNA 単独の濃縮ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて DNA のみを濃縮する推奨ワークフローを示しています。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、DNA 8 サンプルを想定しています。

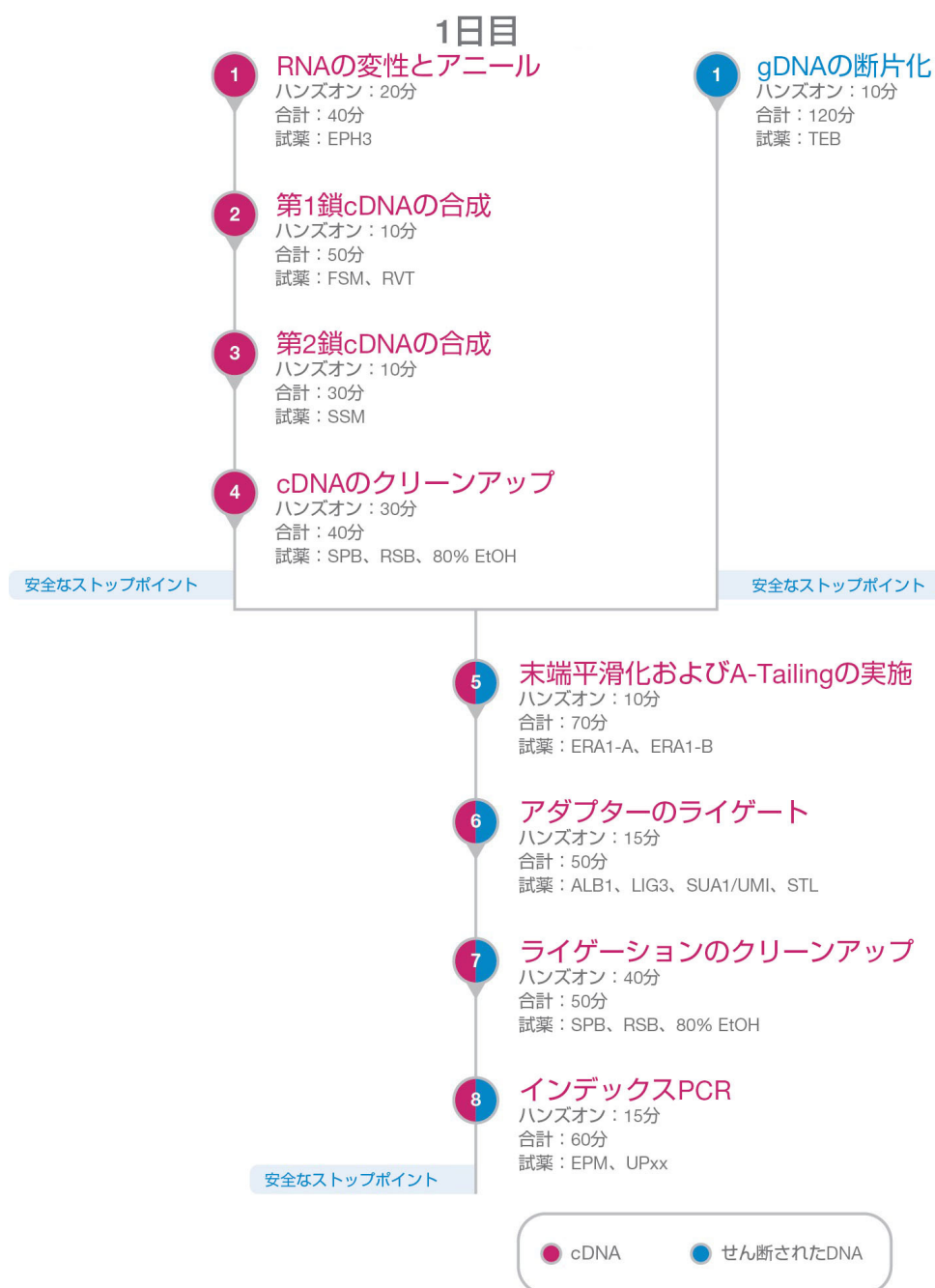
図 2 TruSight Oncology 500 Kit の DNA 単独ワークフロー（パート 2）



DNA および RNA のライブラリー調製ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて DNA および RNA のライブラリー調製を行う推奨ワークフローを示しています。RNA ライブラリーと DNA ライブラリーは同時に調製することができます。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、DNA 8 サンプルおよび RNA 8 サンプルを想定しています。Covaris 超音波破碎装置の脱気時間も含まれます。

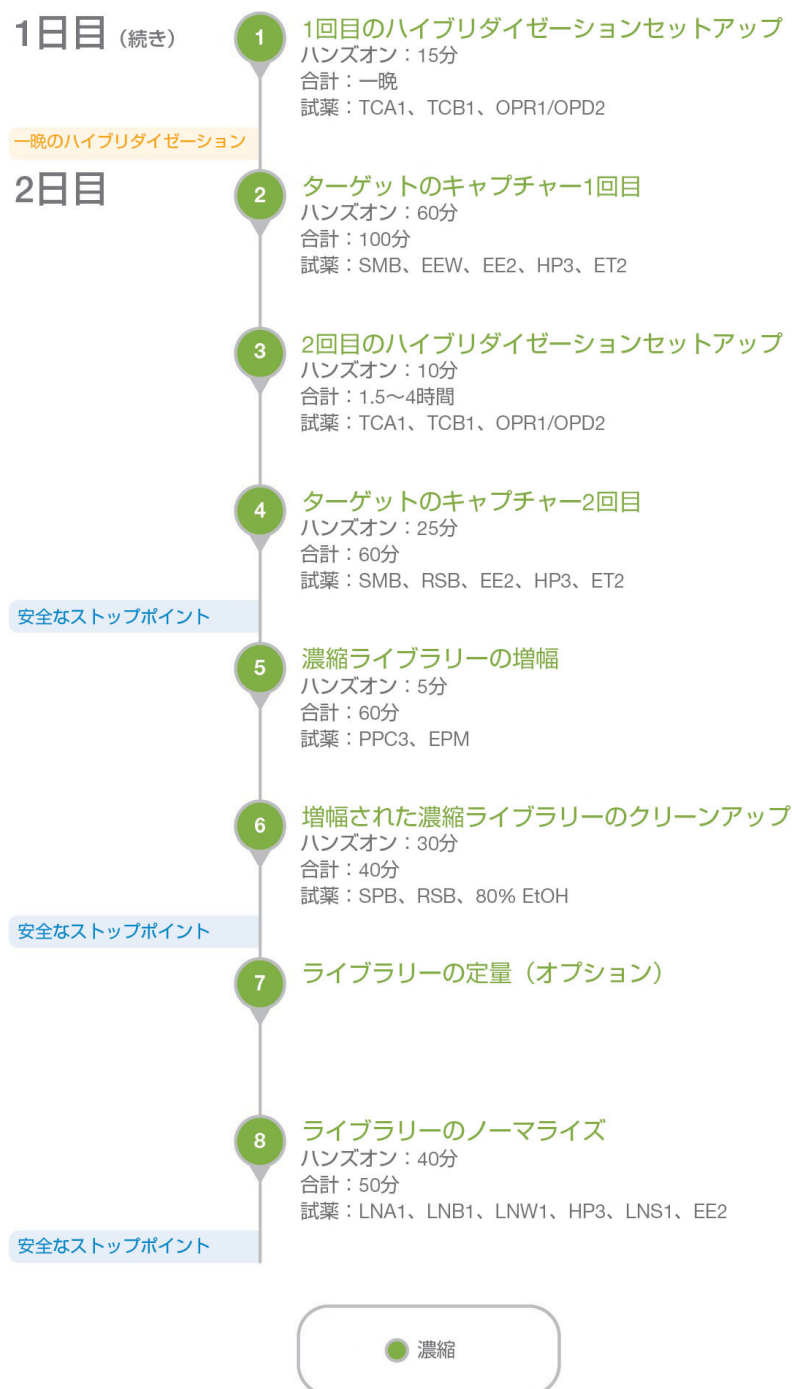
図 3 TruSight Oncology 500 Kit の DNA および RNA ワークフロー（パート 1）



DNA および RNA の濃縮ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて DNA および RNA を濃縮する推奨ワークフローを示しています。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、DNA 8 サンプルおよび RNA 8 サンプルを想定しています。

図 4 TruSight Oncology 500 Kit の DNA および RNA ワークフロー（パート 2）



RNA 単独のライブラリー調製ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて RNA のみのライブラリー調製を行う推奨ワークフローを示しています。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、RNA 8 サンプルを想定しています。

図 5 TruSight Oncology 500 Kit の RNA 単独ワークフロー（パート 1）

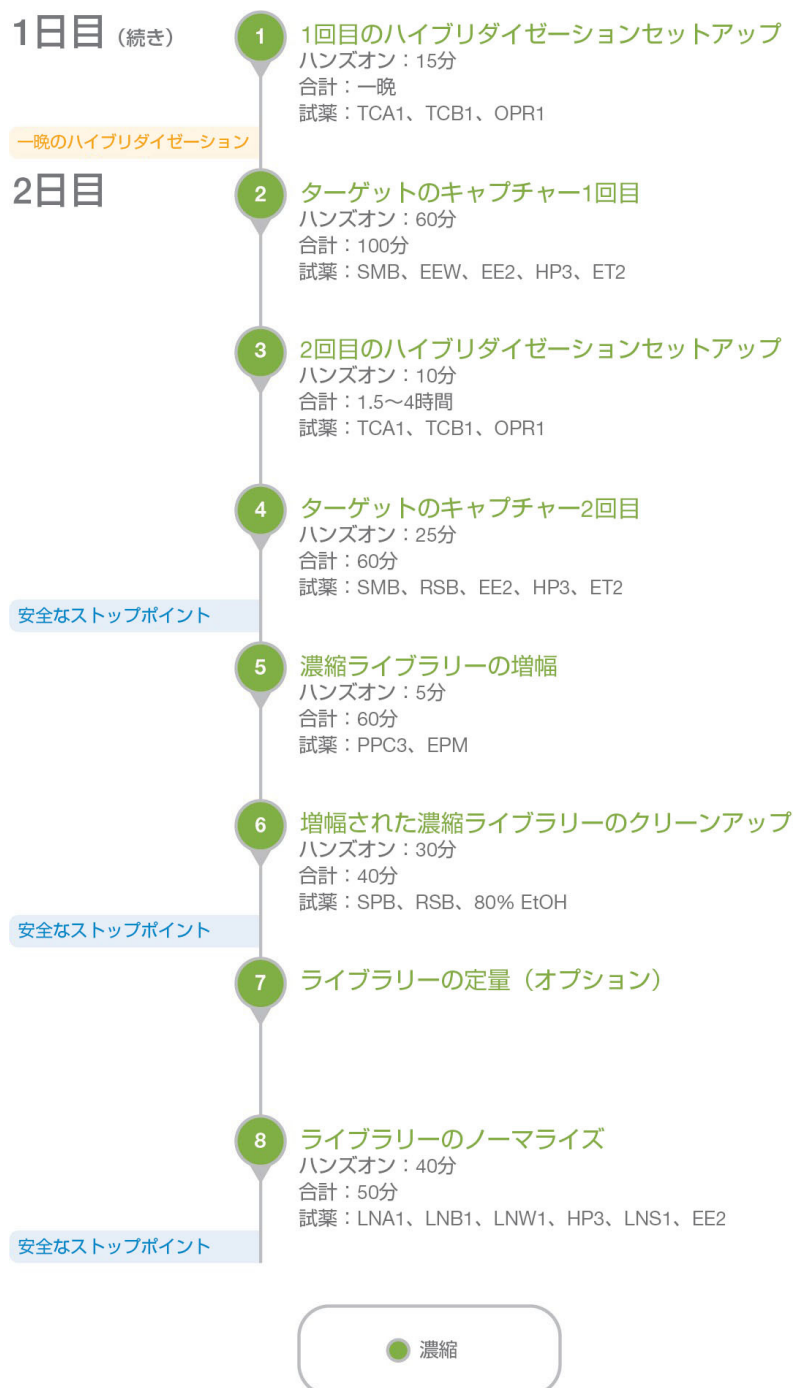
1日目



RNA 単独の濃縮ワークフロー

以下の図は、TruSight Oncology 500 Kit を用いて RNA のみを濃縮する推奨ワークフローを示しています。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。ハンズオンタイムおよび合計時間は概算値であり、RNA 8 サンプルを想定しています。

図 6 TruSight Oncology 500 Kit の RNA 単独ワークフロー（パート 2）



RNAの変性とアニール

このプロセスでは、精製された RNA は cDNA 合成に備えて変性され、ランダムヘキサマーでプライムされます。

精製 DNA のみを用いる場合は、16 ページの「gDNA の断片化」に直接進んでください。

消耗品

- ▶ EPH3 (Elute, Prime, Fragment High Mix 3) (赤色キャップ)
- ▶ FSM (First Strand Synthesis Mix) (赤色キャップ)
- ▶ RVT (Reverse Transcriptase) (赤色キャップ)
- ▶ ヌクレアーゼフリーの水
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

次の手順は RNase フリーおよび DNase フリー環境で実施する必要があります。作業台は RNase 除去クリーナーで完全に除染してください。RNA 専用の機器を必ず使用してください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
EPH3	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
FSM	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
RVT	-25°C ~ -15°C	氷上に静置します。短時間遠心します。

- 2 RNA サンプルを氷上で融解します。
- 3 サンプルの定性および定量を行います。1 ページの「DNA/RNA インプットの推奨事項」を参照してください。
- 4 最終容量が 8.5 μ L となるように、40 ng 以上の RNA サンプルを RNase/DNase フリーの水で希釈します。
- 5 サーマルサイクラーに次のプログラムを保存します。
 - ▶ FFPE または断片化された RNA の場合は、LQ-RNA 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 17 μ L に設定
 - ▶ 65°C で 5 分間
 - ▶ 4°C で保持
 - ▶ 細胞株または Intact RNA の場合は、HQ-RNA 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 17 μ L に設定
 - ▶ 94°C で 8 分間
 - ▶ 4°C で保持
- 6 新しい 96 ウェルの PCR プレートに CF (cDNA Fragments) と記載します。

手順

- 1 マイクロチューブに次の量を加えて、FSM+RVT マスターミックスを調製します。

マスターミックスのコンポーネント	3 サンプル (μL)	8 サンプル (μL)	16 サンプル (μL)	24 サンプル (μL)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

- ▶ 使用後は、残ったマスターミックスをすべて廃棄します。
- 2 ピペティングして混合します。
 - 3 FSM+RVT マスターミックスは、13 ページの「第 1 鎖 cDNA の合成」まで氷上に静置します。
 - 4 精製された RNA サンプルを 8.5 μL ずつ、CF PCR プレートの対応するウェルに添加します。
 - 5 各ウェルに EPH3 を 8.5 μL 添加します。
 - 6 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 1 分間攪拌します。
 - 7 プレートを 280 × g で 1 分間遠心します。
 - 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、LQ-RNA または HQ-RNA プログラムを実行します。

第 1 鎖 cDNA の合成

このプロセスでは、逆転写酵素を用いて、ランダムヘキサマーでプライムした RNA 断片を第 1 鎖 cDNA に逆転写します。

消耗品

- ▶ FSM+RVT マスターミックス
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール

事前準備

- 1 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに、以下の 1stSS 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 μL 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

- 1 サーマルサイクラーから CF PCR プレートを取り出します。
- 2 ピペティングして FSM+RVT マスターミックスを混合します。
- 3 各ウェルに 8 μL の FSM+RVT マスターミックスを添加します。
- 4 5 回ピペティングして混合します。
- 5 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 1 分間攪拌します。
- 6 プレートを 280 × g で 1 分間遠心します。
- 7 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上にプレートを置き、1stSS プログラムを実行します。
- 8 DNA ライブラリーも調製する場合、1stSS プログラムの実行中に gDNA 断片化を開始できます。16 ページの「gDNA の断片化」を参照してください。

第2鎖 cDNA の合成

このプロセスでは RNA テンプレートを取り除き、二本鎖 cDNA を合成します。

消耗品

- ▶ SSM (Second Strand Mix) (赤色キャップ)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
SSM	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。10 回転倒混和します。 短時間遠心します。

- 2 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに、以下の 2ndSS プログラムを保存します。



注意

リッド温度を 30°C に設定することができない場合は、プレヒートリッドオプションをオフにします。

- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、30°C に設定
- ▶ 反応量を 50 µL に設定
- ▶ 16°C で 25 分間
- ▶ 4°C で保持

手順

- 1 サーマルサイクラーから CF PCR プレートを取り出します。
- 2 各ウェルに SSM を 25 µL 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 1 分間攪拌します。
- 4 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上にプレートを置き、2ndSS プログラムを実行します。

cDNA のクリーンアップ

このプロセスでは、SPB を用いて不要な反応成分から cDNA を精製します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SPB (Sample Purification Beads)
- ▶ 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル MIDI プレート (1 ~ 2)
- ▶ (オプション) 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

- ▶ 溶液には粘性があるため、SPB を吸引および分注する際はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
RSB	2°C～8°C、または -25°C～-15°C	室温に戻します。 -25°C～-15°Cで保管していた場合は、使用前に室温で融解してボルテックスします。
SPB	2°C～8°C	最低 30 分間室温に戻します。

- 2 新しい 96 ウェルの MIDI プレートに BIND1 と記載します。
 - ▶ このステップ後にプレートを保管するには、96 ウェル PCR プレートを 사용합니다。
- 3 次のプレートオプションのうちの 1 つを選択してください。
 - ▶ cDNA のクリーンアップ後すぐにライブラリー調製を継続する場合は、新しい 96 ウェルの MIDI プレートに PCF (Purified cDNA Fragments) と記載します。
 - ▶ cDNA のクリーンアップ後にプレートを保管する場合は、新しい 96 ウェルの PCR プレートに PCF (Purified cDNA Fragments) と記載します。
- 4 80% の EtOH を用時調製します。

手順

結合

- 1 サーマルサイクラーから CF PCR プレートを取り出します。
- 2 SPB を 1 分間ボルテックスして、ビーズを懸濁します。
- 3 BIND1 MIDI プレートの各ウェルに、SPB を 90 μ L 添加します。
- 4 CF PCR プレートの各サンプルを 50 μ L ずつ、BIND1 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 5 Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 6 室温で 5 分間インキュベートします。

洗浄

- 1 磁気スタンドに BIND1 MIDI プレートを 5 分間置きます。
- 2 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 3 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a 磁気スタンドに置いた状態で、用時調製した 80% エタノールを各ウェルに 200 μ L ずつ添加します。
 - b 30 秒間待機します。
 - c 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 4 ステップ 3 を繰り返して、ビーズの **2 回目**の洗浄を行います。
- 5 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

溶出

- 1 BIND1 MIDI プレート を磁気スタンドから取り外します。
- 2 各ウェルに RSB を 22 μ L 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 4 室温で 2 分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに 2 分間置きます。
- 6 BIND1 MIDI プレートの各ウェルの溶出液を 20 μ L ずつ、PCF プレートの対応するウェルに移します。
- 7 PCF プレートの各ウェルに RSB を 30 μ L 添加し、10 回以上ピペティングして混合します。
- 8 サンプルタイプに基づき、次のオプションのいずれかを選択します。
 - ▶ **DNA および RNA サンプル**：16 ページの「gDNA の断片化」に進むか、または安全なストップポイントの指示に従います。精製された cDNA 断片およびせん断された DNA サンプルは、同じプレート内に保管できます。ウェルには必ず各サンプルの場所がわかるようにマークしてください。詳しくは、「gDNA の断片化」の「事前準備」のセクションを参照してください。
 - ▶ **RNA サンプルのみ** RNA のみに由来するサンプルを処理し、安全なストップポイントで停止しない場合は、17 ページの「末端平滑化および A-Tailing の実施」に進みます。

安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B' を PCF PCR プレートに貼り、280 \times g で短時間遠心します。-25°C ~ -15°C で最大 7 日間保管できます。

gDNA の断片化

このプロセスでは、Covaris E220*evolution*、LE220、または ME220 Focused-ultrasonicator を用いて、gDNA を 90 ~ 250 bp の断片サイズに断片化します。Covaris によるせん断では、3' または 5' にオーバーハングを有する二本鎖 DNA 断片が生成されます。

消耗品

- ▶ TEB (TE Buffer)
- ▶ ホイルシール付き Covaris 8 microTUBE Strip
- ▶ 96 ウェル MIDI プレート
- ▶ (オプション) 96 ウェル PCR プレート

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
TEB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。転倒混和します。

- 2 Covaris 装置を起動し、メーカーのガイドラインに従ってセットアップします。この装置の脱気には ~ 1 時間かかります。
- 3 次のプレートオプションのうちの 1 つを選択してください。
 - ▶ gDNA せん断後すぐにライブラリー調製を継続する場合は、新しい 96 ウェルの MIDI プレートに LP (Library Preparation) と記載します。
 - ▶ このステップの後に、せん断された gDNA を保管する場合は、新しい 96 ウェルの PCR プレートに LP (Library Preparation) と記載します。
 - ▶ gDNA および cDNA サンプルを同時に処理するには、14 ページの「cDNA のクリーンアップ」の PCF プレートを引き続き使用します。

- 4 gDNA サンプルを室温で融解します。
- 5 転倒混和します。
- 6 サンプルの質や量については、1 ページの「DNA/RNA インプットの推奨事項」を参照してください。
- 7 最終容量が 12 μ L となるように、精製した各 DNA サンプル 40 ng 以上を TEB で希釈します。

手順

- 1 希釈、精製された gDNA サンプルを 12 μ L ずつ Covaris 8 microTUBE Strip に添加します。
- 2 各サンプルに TEB を 40 μ L 添加します。
- 3 ピペティングして混合します。
- 4 Covaris 8 microTUBE Strip の未使用のウェルをすべて、52 μ L の水で満たします。
- 5 microTUBE Strip をホイルシールで密封します。
- 6 短時間遠心します。
- 7 Covaris E220*evolution* モデル、LE220 モデル、または ME220 モデルを使用する場合は、次の設定を用いて gDNA を断片化します。

設定	E220 <i>evolution</i>	LE220	ME220
最大放射電力	175 ワット	450 ワット	50 ワット
デューティー比	10%	30%	30%
バーストあたりのサイクル数	200	200	1,000
持続時間	280 秒間	250 秒間	10 秒間
温度	7°C	7°C	12°C
強度	あり	該当なし	該当なし
その他	強度	該当なし	導波管
パルス反復	該当なし	該当なし	20
平均出力	該当なし	該当なし	15 ワット

- 8 水滴を集めるために、チューブストリップを短時間遠心します。
- 9 せん断された gDNA サンプルそれぞれから、50 μ L を LP プレート（cDNA を同時に処理する場合は PCF プレート）の対応するウェルに移します。
 - ▶ せん断された gDNA サンプルを LP プレートに移す際、先端の細い P20 ピペットを使用すれば、20 μ L + 20 μ L + 10 μ L と 3 回に分けて移すことができます。

安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B' を LP または PCF プレートに貼り、280 × g で短時間遠心します。
-25°C ~ -15°C で最大 7 日間保管できます。

末端平滑化および A-Tailing の実施

このプロセスでは、End Repair A-Tailing (ERA1) マスターミックスを使用して、断片化ステップによって生じた 5' および 3' のオーバーハングを平滑末端に変換します。

このミックスの 3' から 5' のエキソヌクレアーゼ活性は、3' オーバーハングを取り除き、5' から 3' のポリメラーゼ活性は 5' オーバーハングを埋めます。3' 末端はこの反応中に A-Tailing され、アダプターライゲーション反応で互いにライゲーションするのを防ぎます。

消耗品

- ▶ ERA1-A (End Repair A-tailing Enzyme Mix 1)
- ▶ ERA1-B (End Repair A-tailing Buffer 1)
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ **(オプション)** 96 ウェル MIDI プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

gDNA または cDNA サンプルの保管に PCR プレートを使用した場合は、18 ページの「事前準備」に示すステップのプレート移送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。

試薬	保管条件	手順
ERA1-A	-25°C ~ -15°C	氷上に静置します。短時間遠心してから、ピペッティングして混合します。
ERA1-B	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。短時間遠心してから、ピペッティングして混合します。沈殿物が認められる場合、手のひらでチューブを温めてから、ピペッティングして混合し、結晶を溶かします。

- 2 せん断した gDNA および cDNA を室温に戻します。
- 3 96 ウェル PCR プレートで保存した場合、ピペッティングして混合します。次に、せん断した 50 μ L の gDNA サンプルおよび 50 μ L の cDNA を、新しい 96 ウェル MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 4 PCF または LP PCR プレートを -25°C ~ -15°C で保管していた場合は、以下のステップを実行します。
 - ▶ 室温で融解します。
 - ▶ 280 \times g で 1 分間遠心します。
 - ▶ ピペッティングして混合します。
 - ▶ せん断した gDNA および cDNA 全容量を、新しい 96 ウェル MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 5 MIDI プレートに LP2 (Library Preparation 2) と記載します。
- 6 MIDI ヒートブロックインサートをセットした 2 つの Hybex インキュベーターを以下のとおりに予熱します。
 - ▶ 最初のインキュベーターを 30°C に予熱します。
 - ▶ 2 番目のインキュベーターを 72°C に予熱します。
- 7 アイスバケツを準備します。

手順

- 以下の表に示す適切な量をマイクロチューブに加えて、ERA1 マスターミックスを調製します。

マスターミックスのコンポーネント	3 サンプル (μL)	8 サンプル (μL)	16 サンプル (μL)	24 サンプル (μL)
ERA1-B	26	69	138	207
ERA1-A	10	27	54	81

- 10 回ピペティングして混合し、ERA1 マスターミックスを氷上に置きます。
- LP2 MIDI プレートの各サンプルに、10 μL の ERA1 マスターミックスを添加します。
- 使用後は、残ったマスターミックスをすべて廃棄します。
- Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 30°C で 30 分間インキュベートします。
- 72°C のもう一方のインキュベーターにただちに移し、20 分間インキュベートします。
- 氷上にプレートを 5 分間置きます。

アダプターのライゲート

このプロセスでは、cDNA および gDNA 断片の末端にアダプターをライゲートします。SUA1 アダプターは cDNA 断片にのみライゲートします。固有の分子インデックスを含む UMI1 アダプターは、gDNA 断片にのみライゲートします。

消耗品

- ▶ ALB1 (Adapter Ligation Buffer 1)
- ▶ LIG3 (DNA Ligase 3)
- ▶ STL (Stop Ligation Buffer)
- ▶ SUA1 (Short Universal Adapters 1)
- ▶ UMI1 (UMI Adapters v1)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

- ▶ ALB1 には高い粘性があります。気泡ができないように、ピペットでゆっくり添加します。
- ▶ DNA ライブラリーには UMI1 のみ、RNA ライブラリーには SUA1 のみを必ず使用してください。

事前準備

- 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
ALB1	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。10 秒以上ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LIG3	-25°C ~ -15°C	氷上に静置します。短時間遠心してから、ピペティングして混合します。
STL	-25°C ~ -15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
SUA1	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。10 秒以上ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
UMI1	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。10 秒以上ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

手順

- 1 各ウェルに ALB1 を 60 μ L 添加します。
- 2 各ウェルに LIG3 を 5 μ L 添加します。
- 3 適切なアダプターを各ウェルに添加します。
 - ▶ DNA ライブラリーにのみ、UMI1 を 10 μ L 添加します。
 - ▶ RNA ライブラリーにのみ、SUA1 を 10 μ L 添加します。
- 4 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 5 室温で 30 分間インキュベートします。
- 6 各ウェルに STL を 5 μ L 添加します。
- 7 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。

ライゲーションのクリーンアップ

このプロセスでは、SPB を用いて gDNA および cDNA 断片を精製し、不要の産物（非連結のアダプターなど）を除去します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SPB (Sample Purification Beads)
- ▶ 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール
- ▶ 96 ウェル PCR プレート

試薬について

- ▶ 懸濁液には粘性があるため、SPB を吸引および分注する際はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
RSB	2°C ~ 8°C -25°C ~ -15°C	室温に戻します。 -25°C ~ -15°C で保管していた場合は、使用前に室温で融解してボルテックスします。
SPB	2°C ~ 8°C	最低 30 分間室温に戻します。使用前に 1 分間ボルテックスします。

- 2 新しい 96 ウェルの PCR プレートに、LS (Library Samples) と記載します。
- 3 80% の EtOH を用時調製します。

手順

結合

- 1 SPB を 1 分間ボルテックスして、ビーズを懸濁します。
- 2 LP2 MIDI プレートの各ウェルに、SPB を 112 μ L 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 4 室温で 5 分間インキュベートします。

洗浄

- 1 LP2 MIDI プレート を磁気スタンドに 10 分間置きます。
- 2 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 3 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a 磁気スタンドに置いた状態で、用時調製した 80% エタノールを各ウェルに 200 μ L ずつ添加します。
 - b 30 秒間待機します。
 - c 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 4 ステップ 3 を繰り返して、**2 回目**の洗浄を行います。
- 5 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

溶出

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルに RSB を 27.5 μ L 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 4 室温で 2 分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに 2 分間置きます。
- 6 LP2 MIDI プレートの溶出液を 25 μ L ずつ、LS PCR プレートの対応するウェルに移します。

インデックス PCR

このステップでは、サンプルのマルチプレックスを行うために、インデックス配列が結合したプライマーを用いてライブラリー断片を増幅します。増幅後の産物には、インデックス配列とクラスター形成に必要なアダプター配列が付加された完全なライブラリーが含まれます。

消耗品

- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ UPxx (Unique Index Primer)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



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ます。

試薬	保管条件	手順
EPM	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
UPxx	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- ライブラリーごとに、インデックスプライマー UPxx を 1 つ割り当てます (xx = インデックスプライマー番号)。

1 つのフローセルで複数のライブラリーをシーケンスする場合、異なるインデックスプライマーを各サンプルライブラリーに割り当てます。サンプルのレイアウトの向きと、各サンプルのインデックスを記録します。



注意

シーケンスランごとのライブラリー数、および可能となる DNA/RNA の組み合わせについてのガイドラインは、『NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号 15048776）を参照してください。

- DNA と RNA ライブラリーを一緒にシーケンスする場合、2 つのライブラリータイプには必ず異なるインデックスプライマーが含まれるようにしてください。例えば、DNA ライブラリーにインデックスプライマー UP01 が含まれる場合、RNA ライブラリーには異なる UPxx を選択します。
- プレックス数が少ないシーケンスランの場合は、十分なインデックス多様性を得るために、以下の組み合わせのいずれかを含む最低 3 つのライブラリーを使用します。

- ▶ [UP01、UP02、UP03]
- ▶ [UP04、UP05、UP06]
- ▶ [UP07、UP08、UP09]
- ▶ [UP10、UP11、UP12]

例えば、1 つ目のライブラリーは UP01、2 つ目のライブラリーは UP02、3 つ目のライブラリーは UP03 を割り当てます。

- 増幅後エリアで、以下の I-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
- ▶ 以下を 15 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

- 5 µL のインデックスプライマー (UPxx) を LS PCR プレートの各ウェルに添加します。新しいチューブキャップを付けます。
- 各ウェルに EPM を 20 µL 添加します。
- Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 1 分間攪拌します。



警告

増幅産物のキャリーオーバーを防ぐために、増幅後エリアで以下のステップを実行してください。

- 280 × g で短時間遠心します。
- 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、I-PCR プログラムを実行します。
- プレート名を ALS (Amplified Library Samples) と記載し直します。
- 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、Microseal 'B' を ALS プレートに貼り、-25°C ~ -15°C で最大 30 日間保管できます。

1 回目のハイブリダイゼーションセットアップ

このプロセス中に、21 ページの「インデックス PCR」で調製したライブラリーに対し、55 遺伝子に特異的なオリゴプールが RNA ライブラリーに、523 遺伝子に特異的なオリゴプールが DNA ライブラリーにそれぞれハイブリダイズします。ターゲット領域の濃縮には、2 回のハイブリダイゼーションステップが必要です。1 回目のハイブリダイゼーションステップでは、オリゴが DNA および RNA ライブラリーに一晩(8 ~ 24 時間)でハイブリダイズします。

消耗品

- ▶ OPD2 (Oncology Probes DNA 2) (黄色キャップ)
- ▶ OPR1 (Oncology Probes RNA 1) (赤色キャップ)
- ▶ TCA1 (Target Capture Additives 1)
- ▶ TCB1 (Target Capture Buffer 1)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

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

試薬について

- ▶ DNA ライブラリーにのみ OPD2 を使用します (黄色キャップ)。
- ▶ RNA ライブラリーにのみ OPR1 を使用します (赤色キャップ)。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
OPD2	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPR1	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
TCA1	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
TCB1	2°C ~ 8°C	室温に戻して融解します。短時間遠心してから、ピペティングして混合します。沈殿物がないかを確認します。沈殿物が認められる場合、手のひらでチューブを温めてから、ピペティングして混合し、結晶を溶かします。

- 2 ALS PCR プレートを -25°C ~ -15°C で保管していた場合は、次の手順で調製します。
 - a 室温で融解します。
 - b 250 × g で 1 分間遠心します。
 - c ピペティングして混合します。
- 3 新しい 96 ウェルの PCR プレートに HYB1 (Hybridization 1) と記載します。

- 4 サーマルサイクラーに次の HYB1 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 50 μ L に設定
 - ▶ 95°Cで 10 分間
 - ▶ 85°Cで 2.5 分間
 - ▶ 75°Cで 2.5 分間
 - ▶ 65°Cで 2.5 分間
 - ▶ 57°Cで保持

手順

- 1 各ライブラリー 20 μ L を HYB1 PCR プレートに移します。
- 2 各ウェルに TCB1 を 15 μ L 添加します。
- 3 各ウェルに TCA1 を 10 μ L 添加します。
- 4 以下に示す適切なプローブを添加します。
 - ▶ DNA ライブラリーには、OPD2 (黄色キャップ) を 5 μ L 添加します。
 - ▶ RNA ライブラリーには、OPR1 (赤色キャップ) を 5 μ L 添加します。
- 5 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 2 分間攪拌します。
- 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、HYB1 プログラムを実行します。57°Cで 8 ~ 24 時間 (一晚) ハイブリダイズします。

ターゲットのキャプチャー 1 回目

このステップでは、SMB (Streptavidin Magnetic Beads) を用いて、対象ライブラリー DNA 領域にハイブリダイズされたプローブをキャプチャーします。EEW を用いて、加熱下で 3 回洗浄することで、非特異的に結合した DNA をビーズから除去できます。濃縮されたライブラリーがビーズから溶出後、2 回目のハイブリダイゼーション用に調製されます。

消耗品

- ▶ EE2 (Enrichment Elution 2)
- ▶ 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 MIDI プレート
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

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

試薬について

- ▶ この手順では、**SPB** ではなく、**SMB** を必ず使用してください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
EE2	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
EEW	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。1分間ボルテックスして懸濁します。
ET2	2℃～8℃	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
HP3	2℃～8℃	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
SMB	2℃～8℃	30分間室温に戻します。ビーズペレットがある場合、上下にピペティングしてペレットを剥がした後、ボルテックスして懸濁します。

- 2 MIDI ヒートブロックインサートをセットした Hybex インキュベーターを 57℃に予熱します。
- 3 新しい96 ウェルの MIDI プレートに CAP1 (Capture 1) と記載します。
- 4 新しい96 ウェルの PCR プレートに ELU1 (Elution 1) と記載します。

手順

結合

- 1 サーマルサイクラーから HYB1 PCR プレートを取り出します。
- 2 SMB を 1分間ボルテックスして、ビーズを懸濁します。
- 3 CAP1 MIDI プレートの各ウェルに、SMB を 150 μ L 添加します。
- 4 HYB1 PCR プレートの各ライブラリーを 50 μ L ずつ、CAP1 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 5 CAP1 MIDI プレートに Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2分間攪拌します。
- 6 Hybex インキュベーターを使用して、57℃で 25分間インキュベートします。
- 7 磁気スタンドに 2分間置きます。
- 8 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のまま、ピペットを用いて上清を各ウェルから取り除き、廃棄します。

洗浄

- 1 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a CAP1 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - b 各ウェルに EEW を 200 μ L 添加します。
 - c 10回ピペティングして混合します。
 - d Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 4分間攪拌します。ビーズペレットが残っている場合は、Microseal を取り外し、ピペティングして混合します。ビーズがすべて懸濁していることを確認してから、新しい Microseal 'B' を貼ります。
 - e Hybex インキュベーターを使用して、57℃で 5分間インキュベートします。
 - f 磁気スタンドに 2分間置きます。
 - g 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のまま、すべての上清を各ウェルから取り除き、廃棄します。
- 2 ステップ 1 を繰り返して、ビーズの **2回目**の洗浄を行います。
- 3 ステップ 1 を繰り返して、ビーズの **3回目**の洗浄を行います。
- 4 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清すべてを各ウェルから除去します。

溶出

- 1 マイクロチューブに次の量を加えて、EE2+HP3 溶出液ミックスを調製します。

溶出液ミックスのコンポーネント	3 ライブラリー (μL)	8 ライブラリー (μL)	16 ライブラリー (μL)	24 ライブラリー (μL)
EE2	95	171	342	513
HP3	5	9	18	27

- ▶ 最低でも 3 ライブラリー分を調製します。
 - ▶ 使用後は、残った溶出液ミックスをすべて廃棄します。
- 2 短時間ボルテックスして混合します。
 - 3 CAP1 MIDI プレート を磁気スタンドから取り外します。
 - 4 各サンプルペレットに EE2+HP3 溶出液ミックス 17 μL を慎重に添加します。
 - 5 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
 - 6 磁気スタンドに 2 分間置きます。
 - 7 CAP1 MIDI プレートの各ウェルの溶出液 15 μL を、ELU1 PCR プレートに慎重に移します。
 - 8 5 μL の ET2 を、ELU1 PCR プレートの各溶出液に添加します。
 - 9 ELU1 PCR プレートに Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 2 分間攪拌します。

2 回目のハイブリダイゼーションセットアップ

このステップでは、濃縮 DNA および RNA ライブラリーの対象領域とキャプチャープローブの 2 回目の結合を行います。2 回目のハイブリダイゼーションで、キャプチャーされた領域の特異性を確実に高めます。ライブラリー濃縮を確実に最適化するために、2 回目のハイブリダイゼーションステップは 1.5 時間～ 4 時間行います。

消耗品

- ▶ OPD2 (Oncology Probes DNA 2) (黄色キャップ)
- ▶ OPR1 (Oncology Probes RNA 1) (赤色キャップ)
- ▶ TCA1 (Target Capture Additives 1)
- ▶ TCB1 (Target Capture Buffer 1)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

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

試薬について

- ▶ OPD2 は DNA ライブラリーにのみ使用します。
- ▶ OPR1 は RNA ライブラリーにのみ使用します。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
OPD2	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPR1	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
TCA1	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
TCB1	2℃～8℃	室温に戻して融解します。短時間遠心してから、ピペティングして混合します。沈殿物が認められる場合、手のひらでチューブを温めてから、ピペティングして混合し、結晶を溶かします。

- 2 サーマルサイクラーに次の HYB2 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 50 μ L に設定
- ▶ 95℃で 10 分間
- ▶ 85℃で 2.5 分間
- ▶ 75℃で 2.5 分間
- ▶ 65℃で 2.5 分間
- ▶ 57℃で保持

手順

- 1 ELU1 PCR プレートの各ウェルに、TCB1 を 15 μ L 添加します。
- 2 各ウェルに TCA1 を 10 μ L 添加します。
- 3 適切なプローブを各ウェルに添加します。
 - ▶ DNA ライブラリーには、OPD2（黄色キャップ）を 5 μ L 添加します。
 - ▶ RNA ライブラリーには、OPR1（赤色キャップ）を 5 μ L 添加します。
- 4 Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,200 rpm で 2 分間攪拌します。
- 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、HYB2 プログラムを実行します。57℃で 1.5 ～ 4 時間ハイブリダイズします。

ターゲットのキャプチャー 2 回目

このステップでは、SMB（Streptavidin Magnetic Beads）を用いて、対象領域にハイブリダイズされたプローブをキャプチャーします。RSB は、キャプチャーされたライブラリーをすすぎ、ビーズから非特異的な結合を除去するために用いられます。濃縮されたライブラリーがビーズから溶出後、シーケンスに向けた準備に進むことができます。

消耗品

- ▶ EE2（Enrichment Elution 2）
- ▶ ET2（Elute Target Buffer 2）
- ▶ HP3（2 N NaOH）
- ▶ RSB（Resuspension Buffer）
- ▶ SMB（Streptavidin Magnetic Beads）
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ
- ▶ **（オプション）** 15 mL コニカルチューブ
- ▶ 96 ウェル MIDI プレート
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

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

試薬について

- この手順では、**SPB** ではなく、**SMB** を必ず使用してください。

事前準備

- 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
EE2	-25°C ~ -15°C	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
ET2	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
HP3	2°C ~ 8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
RSB	2°C ~ 8°C または -25°C ~ -15°C	室温に戻します。使用前にボルテックスしてください。 -25°C ~ -15°C で保管していた場合は、使用前に室温で融解してボルテックスします。
SMB	2°C ~ 8°C	30 分間室温に戻します。 ビーズペレットがある場合、上下にピペティングしてペレットを剥がした後、ボルテックスして懸濁します。

- MIDI ヒートブロックインサートをセットした Hybex インキュベーターを 57°C に予熱します。
- 新しい 96 ウェルの MIDI プレートに CAP2 (Capture 2) と記載します。
- 新しい 96 ウェルの PCR プレートに ELU2 (Elution 2) と記載します。

手順

結合

- サーマルサイクラーから ELU1 PCR プレートを取り出します。
- SMB を 1 分間ボルテックスして、ビーズを懸濁します。
- CAP2 MIDI プレートの各ウェルに、SMB を 150 μ L 添加します。
- ELU1 PCR プレートの各ライブラリーを 50 μ L ずつ、CAP2 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- CAP2 MIDI プレートに Microseal 'B' を貼り、CAP2 MIDI プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- Hybex インキュベーターを使用して、57°C で 25 分間インキュベートします。
- 磁気スタンドに 2 分間置きます。
- 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のまま、ピペットを用いて上清を各ウェルから慎重に取り除き、廃棄します。

洗浄

- 次の手順で洗浄します。
 - CAP2 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - 各ウェルに RSB を 200 μ L 添加します。
 - Microseal 'B' を貼り、プレートを 1,800 rpm で 4 分間攪拌します。

- d ビーズペレットが残っている場合は、Microseal を取り外し、ピペティングして混合し、ビーズがすべて懸濁されていることを確認します。新しい Microseal 'B' を貼ります。
 - e 磁気スタンドに 2 分間置きます。
 - f プレートを磁気スタンド上に置いたまま、ピペットを用いて上清を慎重に取り除き、廃棄します。
- 2 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清すべてを各ウェルから除去します。

溶出

- 1 マイクロチューブに次の量を加えて、EE2+HP3 溶出液ミックスを調製します。

溶出液ミックスのコンポーネント	3 ライブラリー (μL)	8 ライブラリー (μL)	16 ライブラリー (μL)	24 ライブラリー (μL)
EE2	95	209	418	627
HP3	5	11	22	33

- ▶ 最低でも 3 ライブラリー分を調製します。
 - ▶ 使用後は、残った溶出液ミックスをすべて廃棄します。
- 2 ボルテックスして混合します。
 - 3 CAP2 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - 4 各サンプルペレットに EE2+HP3 溶出液ミックス 22 μL を慎重に添加します。
 - 5 Microseal 'B' を貼り、CAP2 MIDI プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
 - 6 磁気スタンドに 2 分間置きます。
 - 7 CAP2 MIDI プレートの各ウェルの溶出液 20 μL を、ELU2 PCR プレートに移します。
 - 8 5 μL の ET2 を、ELU2 PCR プレートの各溶出液に添加します。
 - 9 ELU2 PCR プレートに Microseal 'B' を貼り、ELU2 PCR プレートを 1,200 rpm で 2 分間攪拌します。
 - 10 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、ELU2 プレートを、-25°C ~ -15°C で最長 7 日間保管できます。

濃縮ライブラリーの増幅

このステップでは、プライマー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)
- ▶ PPC3 (PCR Primer Cocktail 3)
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



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ます。

試薬	保管条件	手順
EPM	-25℃～-15℃	氷上で融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
PPC3	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 ELU2 PCR プレートを -25℃～-15℃で保管していた場合は、次の手順で調製します。

- a 室温で融解します。
- b 250 × g で 1 分間遠心します。
- c ピペティングして混合します。

- 3 サーマルサイクラーに次の EL-PCR 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 50 μL に設定
- ▶ 98℃で 30 秒間
- ▶ 以下を 18 サイクル：
 - ▶ 98℃で 10 秒間
 - ▶ 60℃で 30 秒間
 - ▶ 72℃で 30 秒間
- ▶ 72℃で 5 分間
- ▶ 10℃で保持

手順

- 1 ELU2 PCR プレートの各ウェルに、PPC3 を 5 μL 添加します。
- 2 各ウェルに EPM を 20 μL 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、ELU2 PCR プレートを 1,200 rpm で 2 分間攪拌します。
- 4 280 × g で短時間遠心します。
- 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、EL-PCR プログラムを実行します。

増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ

このステップでは、SPB (Sample Purification Beads) を用いて、不要な反応成分から濃縮ライブラリーを精製します。

消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SPB (Sample Purification Beads)
- ▶ 用時調製した 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル MIDI プレート
- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

溶液には粘性があるため、SPB を吸引および分注する際はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
RSB	2°C～8°C、または -25°C～-15°C	室温に戻します。 -25°C～-15°Cで保管していた場合は、使用前に室温で融解してボルテックスします。
SPB	2°C～8°C	最低 30 分間室温に戻します。

- 2 新しい 96 ウェルの MIDI プレートに BIND2 と記載します。
- 3 新しい 96 ウェルの PCR プレートに PL (Purified Libraries) と記載します。
- 4 80% の EtOH を用時調製します。

手順

結合

- 1 サーマルサイクラーから ELU2 PCR プレートを取り出します。
- 2 SPB を 1 分間ボルテックスして、ビーズを懸濁します。
- 3 BIND2 MIDI プレートの各ウェルに、SPB を 110 μ L 添加します。
- 4 ELU2 PCR プレートの各ライブラリーを 50 μ L ずつ、BIND2 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 5 Microseal 'B' を貼り、BIND2 MIDI プレートを 1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 6 室温で 5 分間インキュベートします。

洗浄

- 1 磁気スタンドに BIND2 MIDI プレートを 5 分間置きます。
- 2 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 3 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a 磁気スタンドに置いた状態で、用時調製した 80% エタノールを各ウェルに 200 μ L ずつ添加します。
 - b 30 秒間待機します。
 - c 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 4 ステップ 3 を繰り返して、ビーズの **2 回目**の洗浄を行います。
- 5 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

溶出

- 1 BIND2 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 2 各ウェルに RSB を 32 μ L 添加します。
- 3 Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 4 室温で 2 分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに 2 分間置きます。
- 6 BIND2 MIDI プレートの溶出液を 30 μ L ずつ、PL PCR プレートの対応するウェルに移します。

安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B' を PL プレートに貼り、280 × g で短時間遠心します。-25°C ~ -15°C で最大 30 日間保管できます。

ライブラリーの定量（オプション）

正確に定量して、フローセルでのクラスタリングに十分なライブラリーがあることを確認します。蛍光定量法（ユーザー側で用意）で濃縮ライブラリー量を評価してから、ライブラリーのノーマライゼーションを行ってください。ビーズベースのライブラリーノーマライゼーションを効率化するには、各ライブラリー 3 ng/μL 以上が必要です。AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit は、このプロトコールでのライブラリーの定量に有効なことが実証されています。

推奨ガイドライン（AccuClear）

- 6 μL の DNA スタンドを 44 μL の RSB と混合し、DNA スタンドを 3 ng/μL に希釈します。
- RSB をブランクとして使用します。
- 希釈した AccuClear DNA スタンドおよびブランクをトリPLICATEで測定します。
- 単一レPLICATEでライブラリーを測定します。
- DNA スタンドおよびブランクに対し、平均の相対蛍光単位（RFU）をそれぞれ算出します。
- 次の値を計算します。
 - ▶ 平均標準 RFU - 平均ブランク RFU = 正規化標準 RFU
 - ▶ ライブラリー RFU - 平均ブランク RFU = 各ライブラリーの正規化 RFU

量の評価

次の基準に対して各ライブラリーの結果として生じる正規化 RFU を評価します。

蛍光測定	推奨
平均ブランク RFU 以下	精製された DNA サンプルが量および品質の規格を満たす場合は、ライブラリー調製および濃縮を再度実施してください。
平均ブランク RFU 以上、正規化標準 RFU 未満	「ライブラリーのノーマライズ」に進みます。 注意：正規化された標準 RFU 未満の RFU のライブラリーを使用すると、サンプル内に存在する可能性のあるバリエーションを確実にコールするためのシーケンス結果が十分に得られない可能性があります。
正規化標準 RFU 以上	「ライブラリーのノーマライズ」に進みます。

ライブラリーのノーマライズ

このプロセスでは、ビーズベースのノーマライゼーションを用いて、プールされたライブラリーにおいて各ライブラリーが確実に均一化されるよう、各ライブラリー量をノーマライズします。

消耗品

- ▶ EE2（Enrichment Elution 2）
- ▶ HP3（2 N NaOH）
- ▶ LNA1（Library Normalization Additives 1）
- ▶ LNB1（Library Normalization Beads 1）
- ▶ LNS1（Library Normalization Storage 1）
- ▶ LNW1（Library Normalization Wash 1）
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ（2 本）
- ▶ 96 ウェル MIDI プレート

- ▶ 96 ウェル PCR プレート
- ▶ Microseal 'B' 粘着シール



警告

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

試薬について

- ▶ 懸濁液には粘性があるため、LNB1 を吸引および分注する際はゆっくり行ってください。

事前準備

- 1 次の消耗品を準備します。

試薬	保管条件	手順
EE2	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LNA1	-25℃～-15℃	室温に戻して融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
HP3	2℃～8℃	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LNB1	2℃～8℃	最低 30 分間室温に戻します。LNB1 ペレットを上下にピペティングして懸濁させます。
LNS1	2℃～8℃	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LNW1	2℃～8℃	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。

- 2 PL プレートを -25℃～-15℃ で保管していた場合は、室温で融解し、ピペティングして混合し、遠心します。
- 3 新しい 96 ウェルの MIDI プレートに BBN (Bead-Based Normalization) と記載します。
- 4 新しい 96 ウェルの PCR プレートに NL (Normalized Libraries) と記載します。

手順

- 1 LNB1 チューブを最大速度で 1 分間パルスボルテックスします。
LNB1 チューブを転倒混和し、すべてのビーズを確実に懸濁します。ビーズペレットが残っている場合は、ボルテックスの手順を繰り返します。
- 2 800 μL に設定した P1000 ピペットを使用して、LNB1 を上下に 10 回ピペティングして混合します。



警告

チューブの底のビーズペレットを完全に懸濁することが重要です。懸濁は、一貫したクラスター密度を得るために必要となります。

- 3 新しいマイクロチューブに次の試薬を混和して、LNA1+LNB1 マスターミックスを調製します。

マスターミックスのコンポーネント	3 ライブラリー (μL)	8 ライブラリー (μL)	16 ライブラリー (μL)	24 ライブラリー (μL)
LNA1	132	352	704	1056
LNB1	24	64	128	192

- 4 ボルテックスして混合します。

- 5 新しいマイクロチューブ内で次の試薬を混和して、EE2+HP3 溶出液ミックスを用時調製します。

溶出液ミックスのコンポーネント	3 ライブラリー (μL)	8 ライブラリー (μL)	16 ライブラリー (μL)	24 ライブラリー (μL)
EE2	114	304	608	912
HP3	6	16	32	48

- 6 ボルテックスして混合します。

結合

- 1 LNA1+LNB1 マスターミックスをボルテックスします。
- 2 BBN MIDI プレートの各ウェルに、LNA1+LNB1 マスターミックスを 45 μL 添加します。
- 3 PL PCR プレートの各ライブラリーを 20 μL ずつ、BBN MIDI プレートの対応するウェルに添加します。
- 4 BBN MIDI プレートに Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 30 分間攪拌します。
- 5 磁気スタンドに BBN MIDI プレートを 2 分間置きます。
- 6 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。

洗浄

- 1 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a BBN MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - b 各ウェルに LNW1 を 45 μL 添加します。
 - c Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 5 分間攪拌します。
 - d 磁気スタンドに 2 分間置きます。
 - e 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 2 ステップ 1 を繰り返して、**2 回目**の洗浄を行います。
- 3 先端が細い P20 ピペットを用いて、残った上清すべてを各ウェルから除去します。

溶出

- 1 BBN MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 2 EE2+HP3 溶出液ミックスをボルテックスし、短時間遠心します。
- 3 各ウェルに EE2+HP3 溶出液ミックス 32 μL を慎重に添加します。
- 4 Microseal 'B' を貼り、1,800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 5 磁気スタンドに BBN MIDI プレートを 2 分間置きます。
- 6 BBN MIDI プレートの溶出液を 30 μL ずつ、NL PCR プレートの対応するウェルに移します。
- 7 30 μL の LNS1 を NL PCR プレートの各ライブラリーに添加します。
- 8 上下にピペッティングして混合します。

安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B' を NL プレートに貼り、280 × g で短時間遠心します。-25°C ~ -15°C で最大 30 日間保管できます。

ライブラリーのプリーングおよびローディング濃度への希釈

- 1 ライブラリーのプリーング、変性、およびローディング濃度への希釈については、お使いのシーケンスシステムのライブラリーの変性および希釈のガイドを参照してください。

サポート情報

はじめに	35
キット内容	35
消耗品および機器	38
略語	40

はじめに

本ガイドに記述したプロトコールでは、お客様がこのセクションの内容に目を通し、プロトコールの内容を確認し、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。

キット内容

プロトコールに進む前に、このセクションに記載の試薬が揃っていることを確認してください。

ライブラリー調製キット	カタログ番号
TruSight Oncology 500 DNA Kit (48 サンプルライブラリー調製キットのみ)	20028213
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle (24 サンプルライブラリー調製キットのみ)	20028215
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 サンプルライブラリー調製キットのみ)	20045504
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 サンプルライブラリー調製キットのみ)	20045508
ライブラリー調製キットおよび NextSeq システム試薬	カタログ番号
TruSight Oncology 500 DNA NextSeq Kit (48 サンプルライブラリー調製キットおよび NextSeq キット)	20028214
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle NextSeq Kit (24 サンプルライブラリー調製キットおよび NextSeq キット)	20028216
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 サンプルライブラリー調製キットおよび NextSeq キット)	20045505
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 サンプルライブラリー調製キットおよび NextSeq キット)	20045990
ライブラリー調製キット、および PierianDx Clinical Genomics Workspace へのアクセス	カタログ番号
TruSight Oncology 500 DNA Kit, plus PierianDx (48 サンプルライブラリー調製キットおよび PierianDx)	20032624
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle Kit, plus PierianDx (24 サンプルライブラリー調製キットおよび PierianDx)	20032626
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 サンプルライブラリー調製キットおよび PierianDx)	20045506
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 サンプルライブラリー調製キットおよび PierianDx)	20045509
ライブラリー調製キット、NextSeq システム試薬、および PierianDx Clinical Genomics Workspace へのアクセス	カタログ番号
TruSight Oncology 500 DNA NextSeq Kit, plus PierianDx (48 サンプルライブラリー調製キット、NextSeq キット、PierianDx)	20032625
TruSight Oncology 500 DNA/RNA NextSeq Kit, plus PierianDx (24 サンプルライブラリー調製キット、NextSeq キット、PierianDx)	20032627
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 サンプルライブラリー調製キット、NextSeq キット、PierianDx)	20045507
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 サンプルライブラリー調製キット、NextSeq キット、PierianDx)	20045991

ライブラリー調製

Box 1 - Library Prep – RNA (Pre-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

DNA/RNA bundle を注文された場合は、この Box が届きます。DNA キットを注文された場合は、この Box は届きません。

24 マニュアルキットの数量	32 自動化キットの数量	試薬	内容説明
1	2	EPH3	Elute, Prime, Fragment High Mix 3
1	3	FSM	First Strand Synthesis Mix
1	2	RVT	Reverse Transcriptase
1	2	SSM	Second Strand Mix

Box 2 - Library Prep (Pre-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明
2	3	UMI1	UMI Adapters v1

Box 3 - Library Prep (Pre-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明
2	3	ALB1	Adapter Ligation Buffer 1
2	3	EPM	Enhanced PCR Mix
2	6	ERA1-A	End Repair A-tailing Enzyme Mix 1
2	5	ERA1-B	End Repair A-tailing Buffer 1
2	3	LIG3	DNA Ligase 3
2	2	STL	Stop Ligation Buffer
2	2	SUA1	Short Universal Adapters 1

Box 4 - Library Prep (Pre-Amp)、表内の保管温度を参照

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明	保管温度
1	1	RSB	Resuspension Buffer	2°C～8°C または -25°C～-15°C
2	4	SPB	Sample Purification Beads	2°C～8°C
1	1	TEB	TE Buffer	2°C～8°C

Box 5 - Library Prep – Unique PCR Index Primers (Pre-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明
1	2	UP01	Unique Index Primer 01
1	2	UP02	Unique Index Primer 02
1	2	UP03	Unique Index Primer 03
1	2	UP04	Unique Index Primer 04
1	2	UP05	Unique Index Primer 05
1	2	UP06	Unique Index Primer 06
1	2	UP07	Unique Index Primer 07
1	2	UP08	Unique Index Primer 08
1	2	UP09	Unique Index Primer 09
1	2	UP10	Unique Index Primer 10
1	2	UP11	Unique Index Primer 11
1	2	UP12	Unique Index Primer 12
1	2	UP13	Unique Index Primer 13
1	2	UP14	Unique Index Primer 14
1	2	UP15	Unique Index Primer 15
1	2	UP16	Unique Index Primer 16

濃縮

Box 6 - Enrichment (Post-Amp)、表内の保管温度を参照

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明	保管温度
2	3	ET2	Elute Target Buffer 2	2°C～8°C
2	2	HP3	2 N NaOH	2°C～8°C
1	1	LNB1	Library Normalization Beads 1	2°C～8°C
2	2	LNS1	Library Normalization Storage 1	2°C～8°C
2	2	LNW1	Library Normalization Wash 1	2°C～8°C
1	2	RSB	Resuspension Buffer	2°C～8°C または -25°C～-15°C
2	4	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	2°C～8°C
2	3	SPB	Sample Purification Beads	2°C～8°C
2	3	TCB1	Target Capture Buffer 1	2°C～8°C

Box 7 - Enrichment (Post-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明
3	4	EE2	Enrichment Elution 2
1	1	EEW	Enhanced Enrichment Wash
2	3	EPM	Enhanced PCR Mix
1	1	LNA1	Library Normalization Additives 1
2	3	PPC3	PCR Primer Cocktail 3
2	3	TCA1	Target Capture Additives 1

Box 8 - Enrichment (Post-Amp)、-25°C～-15°Cで保管

24/48 マニュアルキットの数量	32/64 自動化キットの数量	試薬	内容説明
1 (24 キット) / 2 (48 キット)	3	OPD2	Oncology DNA Probes Pool 2

Box 9 - TruSight Oncology 500 Kit Content Set (RNA Only)、-25°C～-15°Cで保管

DNA/RNA bundle を注文された場合は、この Box が届きます。DNA キットを注文された場合は、この Box は届きません。

24 マニュアルキットの数量	32 自動化キットの数量	試薬	内容説明
1	1	OPR1	Oncology RNA Probes Master Pool

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。

プロトコールは、一覧に挙げた製品を用いて最適化および検証されています。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
(オプション) AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 1 DNA Standard	Biotium、カタログ番号：31029
(オプション) AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN、カタログ番号：80234
(オプション) QuantiFluor RNA System	Promega、カタログ番号：E3310
(オプション) Agilent DNA 1000 Kit	Agilent、カタログ番号：5067-1504
(オプション) Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent、カタログ番号：5067-1511
(オプション) Standard Sensitivity RNA Analysis Kit	Agilent、カタログ番号：DNF-471-0500
(オプション) FFPE QC Kit	イルミナ、カタログ番号：WG-321-1001
(オプション) DNA Reference Standard	Horizon Diagnostics、カタログ番号：HD753
(オプション) Universal Human Reference RNA	Agilent、カタログ番号：740000
8 microTUBE Strip (12) (LE220 および E220evolution 用)	Covaris、パーツ番号：520053
8 microTUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (ME220 用)	Covaris、パーツ番号：520240
Rack E220evolution 8 microTUBE Strip adapter (E220evolution 用)	Covaris、パーツ番号：500430
Rack 12 place 8 microTUBE Strip adapter (LE220 用)	Covaris、パーツ番号：500191

消耗品	サプライヤー
Rack 8 microTUBE Strip V2 (ME220 用)	Covaris、パーツ番号：500518
1.7 mL マイクロチューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
15 mL コニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
50 mL コニカルチューブ	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
1 mL 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 ウェル保存プレート、0.8 mL (MIDI プレート)	Fisher Scientific、パーツ番号：AB-0859
96 ウェル PCR プレート、0.2 mL (ポリプロピレン)	一般的なラボ用品サプライヤー
(オプション) 96 ウェルマイクロプレート、黒、透明平底	Corning、パーツ番号：3904
ヌクレアーゼフリー試薬リザーバー (PVC、再使用禁止トラフ)	VWR、パーツ番号：89094-658
Microseal 'B' 粘着シール (粘着プレートシール)	Bio-Rad、パーツ番号：MSB-1001
RNase/DNase フリー水	一般的なラボ用品サプライヤー
ヌクレアーゼフリーの水	一般的なラボ用品サプライヤー
エタノール (200 プルーフ、分子生物学用)	Sigma-Aldrich、パーツ番号：E7023

装置 (増幅前)

機器	サプライヤー
サーマルサイクラー	一般的なラボ用品サプライヤー
ヒートブロック (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
ヒートブロック (Hybex インキュベーター、ヒーティングベース) (2 個)	SciGene、カタログ番号： ● 1057-30-O (115 V) または ● 1057-30-2 (230 V)
MIDI ヒートブロックインサート (Hybex 用) (2 個)	イルミナ、カタログ番号：BD-60-601
テーブルトップ遠心機 (プレート遠心機)	一般的なラボ用品サプライヤー
遠心機 (1.5 mL チューブ)	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド -96	Thermo Fisher、カタログ番号：AM10027
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
プレートシェーカー (BioShake XP)	Q Instruments、パーツ番号：1808-0505
Covaris Focused-ultrasonicator	● Covaris、パーツ番号：500219 (モデル LE220) または ● Covaris、パーツ番号：500429 (モデル E220 <i>evolution</i>) または ● Covaris、パーツ番号：500506 (モデル ME220)
(オプション) 8 microTUBE Strip Prep Station (LE220 および E220 <i>evolution</i> 用)	Covaris、パーツ番号：500327
(オプション) Rack Loading Station (ME220 micro TUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 用)	Covaris、パーツ番号：500523
(オプション) 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent、パーツ番号：G2940CA
(オプション) Fragment Analyzer Automated CE System	Agilent、パーツ番号：M5310AA または M5311AA

装置（増幅後）

機器	サプライヤー
ヒートブロック（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
ヒートブロック（Hybex インキュベーター、96 ウェルプレート）	SciGene、カタログ番号： <ul style="list-style-type: none"> 1057-30-O（115 V） または <ul style="list-style-type: none"> 1057-30-2（230 V）
MIDI ヒートブロックインサート（Hybex 用）	イルミナ、カタログ番号：BD-60-601
テーブルトップ遠心機（プレート遠心機）	一般的なラボ用品サプライヤー
遠心機（1.5 mL チューブ）	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド-96	Thermo Fisher、カタログ番号：AM10027
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
プレートシェーカー（BioShake XP）	Q Instruments、パーツ番号：1808-0505
サーマルサイクラー	一般的なラボ用品サプライヤー
(オプション) 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent、パーツ番号：G2940CA
(オプション) Fragment Analyzer Automated CE System	Agilent、パーツ番号：M5310AA または M5311AA

略語

略語	定義
1stSS	1st Strand Synthesis（第1鎖合成）
2ndSS	2nd Strand Synthesis（第2鎖合成）
ALS	Amplified Library Samples（増幅ライブラリーサンプル）
BBN	Bead Based Normalization（ビーズベースのノーマライゼーション）
CAP1	Capture 1（キャプチャー 1）
CAP2	Capture 2（キャプチャー 2）
cDNA	Complementary DNA（相補的 DNA）
CF	cDNA Fragments（cDNA 断片）
ELU1	Elution 1（溶出液 1）
ELU2	Elution 2（溶出液 2）
gDNA	Genomic DNA（ゲノム DNA）
HQ-RNA	High-quality RNA（高品質 RNA）
HYB1	Hybridization 1（ハイブリダイゼーション 1）
HYB2	Hybridization 2（ハイブリダイゼーション 2）
LP	Library Preparation（ライブラリー調製）
LP2	Library Preparation 2（ライブラリー調製 2）
LQ-RNA	Low-quality RNA（低品質 RNA）
LS	Library Samples（ライブラリーサンプル）
NL	Normalized Libraries（ノーマライズされたライブラリー）
PCF	Purified cDNA Fragments（精製された cDNA 断片）
PL	Purified Libraries（精製されたライブラリー）

テクニカルサポート

テクニカル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	

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

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]