



Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation

Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000124435 v03 JPN

2021年4月

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

本文書およびその内容は、Illumina, Inc.およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上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。

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

改訂履歴

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 1000000124435 v03	2021年 4月	SMBをSMB3に更新。
文書番号： 1000000124435 v02	2020年 10月	Respiratory Pathogen ID/AMR Panelの情報とTarget Enrichment Kitのカタログ番号を追加。
文書番号： 1000000124435 v01	2020年 8月	Respiratory Virus Oligos Panel v2を追加。 3-plexのRespiratory Virus Panelライブラリーのノーマライゼーション手順に希釈とプーリングの手順を追加。 処理時間の計算に使用するサンプル数を含めるように、ワークフローの図の説明を更新。 インデックスキット名の形式を修正。
文書番号： 1000000124435 v00	2020年 6月	初版リリース。

目次

概要	1
入力に関する推奨事項	1
追加リソース	2
プロトコール	2
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
ライブラリー調製および濃縮のフロー図.....	5
RNAの変性.....	6
事前準備	6
手順.....	6
1st strand cDNAの合成	7
事前準備	7
手順.....	8
2nd strand cDNAの合成	8
事前準備	8
手順.....	9
cDNAのタグメンテーション	10
事前準備	10
手順.....	11
ライブラリーの精製	13
事前準備	13
手順.....	14
ライブラリーのノーマライゼーション	15
事前準備	15
手順.....	15
プローブのハイブリダイゼーション.....	16
事前準備	16
手順.....	17
ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー	18
事前準備	18
手順.....	19

濃縮ライブラリーの増幅	21
事前準備	21
手順	22
濃縮ライブラリーの精製	22
事前準備	22
手順	22
濃縮ライブラリーのチェック	23
ライブラリーの開始濃度への希釈	24
付録A サポート情報	25
略語	25
キットの内容と保管条件	26
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Samples) (20040536) ...	27
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Samples) (20040537) ...	28
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes、-25℃~-15℃で保管 (96 Indexes, 96 Samples) (20027213、20027214、20042666、20042667)	30
Enrichment Panels (20020183、20044311、20047050、20046969)	30
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kits (RUO)	30
消耗品および機器	32
補助消耗品	32
補助機器	33
テクニカルサポート	34

概要

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

配列特異的なビオチン化プローブで磁気ビーズと結合させ、対象領域をキャプチャーします。キャプチャーされた配列は、洗浄、溶出後、濃縮されたライブラリーのコピーを生成するため増幅されます。限定的なサイクル数のPCRプログラムで濃縮した断片を指数関数的に増幅し、個々の断片をコピーしてライブラリーの量を増やします。

本キットには次のような特徴があります。

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

インプットに関する推奨事項

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

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

RVOPおよびRPIPパネルユーザーのみ：Respiratory Virus Oligo PanelおよびRespiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panelには、DNAとRNAの両方のターゲットが含まれているため、総核酸、あるいは同じサンプルから別々に溶出された同体積のDNA・RNAのプールのいずれかのインプットを使用します。10~100 ngの総核酸のインプットが推奨されます。インプットの一部としてDNAが含まれている場合は、プロトコールの一部としてDNaseステップを実行しないでください。

追加リソース

以下のリソースには、Illumina RNA Prep with Enrichmentでのライブラリー調製の手順とガイドラインが記載されています。詳細については、Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentationのサポートページをご覧ください。

- サンプル情報の記録、ライブラリーのシーケンス、データの解析に対応している製品と要件
- 本キットの使用に関するQ&A
- 本キットに関するトレーニングビデオと、関連する製品およびトピックの各種コース
- 本キットの最新版マニュアル

リソース	説明
Custom Protocol Selector	ライブラリー調製法、ランパラメーター、および解析方法に応じたend-to-endの手順を生成するための、詳細度を調整するオプションを備えたツール。
『Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation Checklist』（文書番号：1000000124436）	経験豊富なユーザー向けの手順チェックリストが用意されています。
『Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation Consumables & Equipment』（文書番号：1000000124437）	ユーザー側で用意する消耗品および機器についての対話型のチェックリストが用意されています。
『Index Adapters Pooling Guide』（文書番号：1000000041074）	バランスの取れたインデックスコンビネーションを使用して、イルミナのシステムでシーケンスするためのデュアルインデックスライブラリーを調製するためのガイドラインです。
『Illumina Adapter Sequences』（文書番号：1000000002694）	イルミナシーケンステクノロジーに用いられている、イルミナ製オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が用意されています。

プロトコール

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

- サンプルから解析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。
- キットの中身を確認し、ライブラリー調製用試薬、ライブラリー濃縮用試薬、濃縮パネル、インデックスアダプターなど、必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。全項目のリストは、[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 RNA Prep with Enrichment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 DNA/RNA UD Indexesを使用して、ライブラリーをインデックス化します。これらのインデックスプライマーにより、インデックス1 (i7) の配列とインデックス2 (i5) の配列が、断片の各末端に付加されます。インデックス配列の長さはいずれも10 bpです。

- プレックス数が少ない場合に、カラーバランスの取れたプールを作成する方法については、『Index Adapters Pooling Guide』（文書番号：1000000041074）を参照してください。
- インデックスアダプターの配列とその記録方法については、『Illumina Adapter Sequences』（文書番号：11000000002694）を参照してください。

ビーズの取り扱い

本プロトコールでは、AMPure XP、EBLTL、SMB3という、3種類のビーズを使用します。これらのビーズには、それぞれ特有の技術が応用されています。他のもので代用しないでください。

ビーズを取り扱う際は、以下の方法に従ってください。

- ビーズはすべて室温で使用してください。
- 2°C未満で保管されていたAMPure XPまたはSMB3は、絶対に使用しないでください。
- 粘性が高いため、ビーズはゆっくりと吸引し分注してください。
- ビーズは、プロトコール全体にわたって頻繁にボルテックスし、懸濁してください。懸濁後のビーズは、均等に分布しており、色が均一になっています。
- ウェル側面のビーズにも液体がかかるように液体を分注してください。
- 液体はビーズペレットに直接分注してください。
- プレート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、ピペッティングして懸濁します。

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。
- プロトコールに安全な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。
 - このサンプルを複数回使用する必要がある場合は、複数のチューブに分注し、使い切りとしてください。
- 融解した試薬は必要時まで氷上に置いておいてください。試薬はすべて、使用后、保管場所に正しく戻してください。
- プレートは、未使用時にはシールして蓋をし、コンタミネーションを最小限に抑えてください。

プレートのシール

- プロトコール全体にわたって、Microseal 'B'粘着シールを使用してください。このシールは-40°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密閉してください。
- プレートから取り外したシールは、使用后毎回廃棄してください。

プレート間の移動

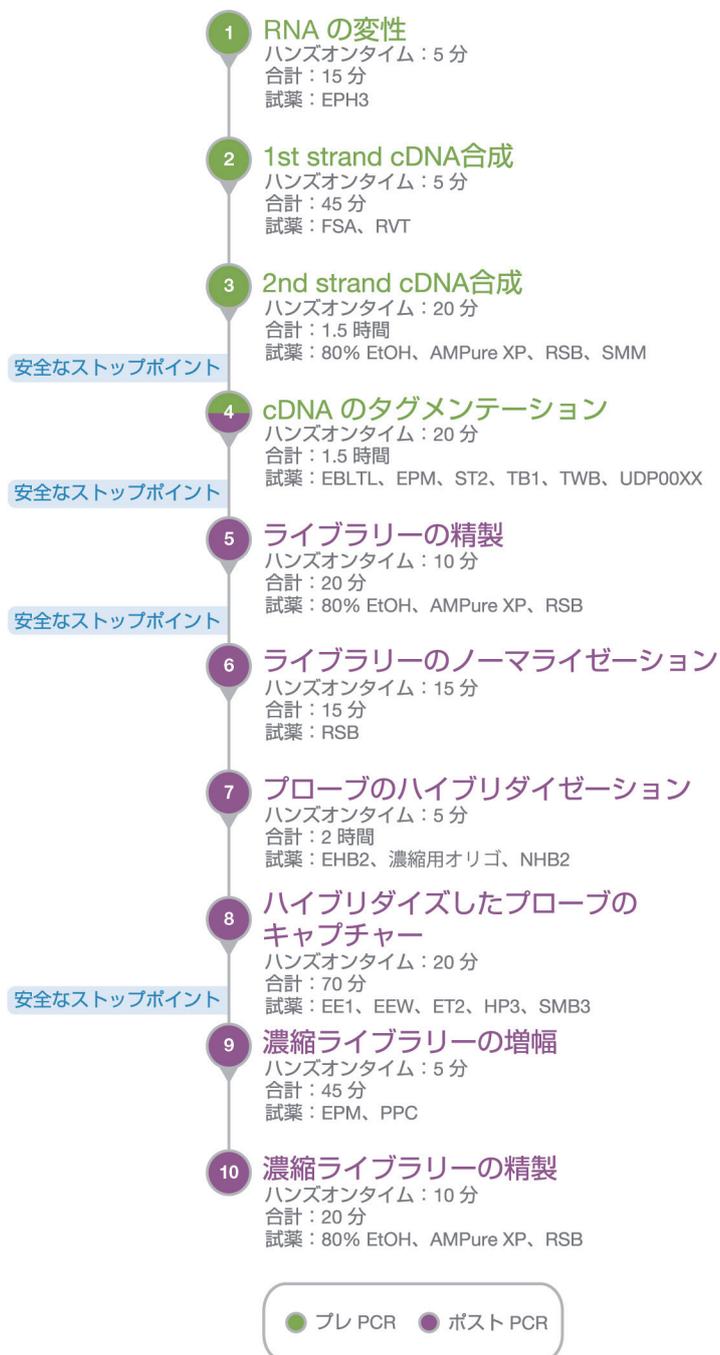
- 溶液をプレートから別のプレートに移す場合は、プレートの各ウェルから特定の分量を取り、別のプレートの対応するウェルに移してください。

遠心分離

- 各ステップにおいて、280 × gで10秒間遠心することで、ウェルの底に液体やビーズを集めてサンプルロスを防ぐことができます。

ライブラリー調製および濃縮のフロー図

下の図に、単一サンプルを使用したIllumina RNA Prep + Enrichmentのプロトコルの概要を示します。安全なストップポイントは、ステップ間に示されています。



RNAの変性

このステップでは、トータルRNAを変性させ、ランダムヘキサマーをアニールします。ランダムヘキサマーがcDNA合成のためにサンプルとプライミングします。

消耗品

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

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

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

2. 以下のDEN_RNAプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
 - 反応量を17 µLに設定します。
 - 65°Cで5分間
 - 4°Cで保持します。

手順

1. 新しいPCRプレートの各ウェル内で、10~100 ngのトータルRNAをヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、8.5 µLになるようにします。
2. 各ウェルにEPH3を8.5 µLずつ添加します。
3. ピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
4. 280 × gで3秒間遠心します。
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、DEN_RNAプログラムを実行します。プログラムの所要時間は計5分間程度です。
6. 280 × gで10秒間遠心します。
7. 直ちに7ページの「[1st strand cDNAの合成](#)」に進みます。各ウェルは、ランダムヘキサマーが結合した変性RNA 17 µLを含有します。

1st strand cDNAの合成

このステップでは、ヘキサマーでプライムされたRNA断片を逆転写し、1st strand cDNAを生成します。

消耗品

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

警告

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

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

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

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

2. 以下のFSSプログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- 反応量を25 µLに設定します。
- 25°Cで10分間
- 42°Cで15分間
- 70°Cで15分間
- 4°Cで保持します。

手順

1. 氷上の1.7 mLチューブ内で以下の分量を正確に混合し、First Strand Synthesis Master Mixを調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
 - FSA (9 μ L)
 - RVT (1 μ L)正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
2. First Strand Synthesis Master Mixをしっかりとピペティングして混合します。
3. 各ウェルにFirst Strand Synthesis Master Mixを8 μ Lずつ添加します。
4. ピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
5. 280 \times gで10秒間遠心します。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、FSSプログラムを実行します。プログラムの所要時間は計43分程度で、各ウェルの液量は25 μ Lです。

2nd strand cDNAの合成

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

消耗品

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

事前準備

1. 無水EtOHから80% EtOHを調製します。
2. 以下のSSSプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、40°Cに設定します。
 - 反応量を50 μ Lに設定します。
 - 16°Cで1時間
 - 4°Cで保持します。

手順

cDNAの生成

1. シールしたPCRプレート¹を280 × gで10秒間遠心します。
2. SMMを転倒混和し、短時間遠心します。
3. 各ウェルにSMMを25 µLずつ添加します。
4. ピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
5. 280 × gで10秒間遠心します。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、SSSプログラムを実行します。プログラムの所要時間は計1時間程度で、各ウェルの液量は50 µLです。

cDNAの精製

1. シールしたPCRプレート¹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. シールし、2,200 rpmで1分間攪拌します。
5. 室温で5分間インキュベートします。
6. 280 × gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
7. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
8. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. 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ずつ添加します。
 - b. 30秒間待ちます。
 - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
10. **2回目**の洗浄をします。
11. 10 µLピペットで、残存するEtOHをすべて除去します。
12. 磁気スタンド上で2分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
13. 磁気スタンドから外します。
14. 各ウェルにRSBを19.5 µLずつ添加します。
15. シールし、2,700 rpmで1分間攪拌します。
16. 室温で2分間インキュベートします。
17. 280 × gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
18. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約4分間）待ちます。
19. 各ウェルから、上清を17.5 µLずつ、新しいPCRプレートに移します。
少量のビーズが残っていても性能には影響ありません。

安全なストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間）。

cDNAのタグメンテーション

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

タグメンテーション後、これらの断片は精製、増幅され、デュアルインデックス化のためのインデックスアダプター配列と、クラスター形成のためのP7およびP5配列が付加されます。インデックスアダプターの選択については、[3ページの「ブーリングの準備」](#)を参照してください。

消耗品

- EBLTL (Enrichment Bead-Linked Transposomes)
- EPM (Enhanced PCR Mix)
- インデックスアダプタープレート (UDP0XXX)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- TWB (Tagmentation Wash Buffer)
- ヌクレアーゼフリー超純水
- 1.7 mLマイクロチューブ
- Microseal 'B'粘着フィルム

試薬について

- インデックスアダプタープレートの各ウェルは使い切りで、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ます。

試薬	保管条件	説明
EBLTL	2°C~8°C	室温に戻し、30秒間ボルテックスして混合します。ビーズがチューブの底に残っている場合は、ビーズが懸濁されるまでボルテックスします。
EPM	-25°C~-15°C	氷上で融解します。転倒混和した後、短時間遠心します。
インデックスアダプタープレート	-25°C~-15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、1,000 × gで1分間遠心します。
ST2	室温	ボルテックスして混合した後、短時間遠心します。
TB1	-25°C~-15°C	室温に戻し、ボルテックスして混合します。
TWB	室温	ボルテックスして混合します。

2. ST2チューブに沈殿物が見られる場合は、
 - a. 37°Cで10分間加熱します。
 - b. 沈殿物が溶解するまでボルテックスします。
 - c. 室温に戻します。
3. 以下のTAGプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
 - 反応量を50 µLに設定します。
 - 55°Cで5分間
 - 10°Cで保持します。
4. 以下のTAG_PCRプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
 - 反応量を50 µLに設定します。
 - 72°Cで3分間
 - 98°Cで3分間
 - サイクル数X：
 - 98°Cで20秒間
 - 60°Cで30秒間
 - 72°Cで1分間
 - 72°Cで3分間
 - 10°Cで保持します。

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

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

手順

EBLTL法によるタグメンテーション

1. シールしたPCRプレートを手で280 × gで10秒間遠心します。
2. 1.7 mLチューブ内で以下の分量を正確に混合し、Tagmentation Master Mixを調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
 - TB1 (11.5 µL)
 - EBLTL (11.5 µL)
 - ヌクレアーゼフリー超純水 (14.5 µL)
 正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
3. Tagmentation Master Mixをしっかりとボルテックスして懸濁させます。

4. 各ウェルにTagmentation Master Mixを32.5 μ Lずつ添加します。
5. しっかりピペティングし、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、TAGプログラムを実行します。プログラムの所要時間は計5分間程度で、各ウェルの液量は50 μ Lです。

タグメンテーションしたcDNAの洗浄

1. シールしたPCRプレート¹を280 \times gで10秒間遠心します。
2. 室温で2分間インキュベートします。
3. 各ウェルにST2を10 μ Lずつ添加します。
4. シールし、2,200 rpmで1分間攪拌します。
5. 室温で5分間インキュベートします。
6. 280 \times gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
7. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。
8. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドから外します。
 - b. 各ウェルにTWBを100 μ Lずつ添加します。
 - c. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
 - d. 280 \times gで3秒間遠心します。
 - e. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。
 - f. 上清をすべて除去し、廃棄します。
10. **2回目**のビーズ洗浄をします。
11. **3回目**のビーズ洗浄をします。**ステップfは省略**します。
過度の乾燥を防ぐため、ウェルにはTWBが残されています。
12. 磁気スタンドに載せたまま、直ちに12ページの「タグメンテーションしたDNAの増幅」に進みます。
各ウェルは、ビーズおよびタグメンテーションしたcDNA 100 μ Lを含有します。

タグメンテーションしたDNAの増幅

1. 以下の分量を正確に混合し、PCR Master Mixを調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
 - EPM (23 μ L)
 - ヌクレアーゼフリー超純水 (23 μ L)正確にピペティングできるよう、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
2. PCR Master Mixをしっかりとボルテックスして混合します。
3. プレートを磁気スタンドに載せたまま、TWBの上清をすべて除去し、廃棄します。
4. 20 μ Lピペットで、残存するTWBをすべて除去します。
気泡が残っても問題はなく、ライブラリーに影響を及ぼすことはありません。
5. 磁気スタンドから外します。
6. 各ウェルにPCR Master Mixを40 μ Lずつ添加します。

7. 各ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、使おうとするインデックスアダプタープレートのウェルを覆っているホイルに穴を開けます。
8. 各ウェルにUDP0XXXを10 μ Lずつ添加します。これらの分量をインデックスアダプタープレートからPCRプレートに移します。
9. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
10. 280 \times gで3秒間遠心します。
11. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、TAG_PCRプログラムを実行します。
プログラムの所要時間は計50~60分間程度で、各ウェルはDNAが結合したビーズ50 μ Lを含有します。

安全なストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間）。または、サーマルサイクラーに載せたままにしておいてください（最長24時間）。

ライブラリーの精製

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

消耗品

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

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

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

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

2. 無水EtOHから80% EtOHを調製します。

手順

1. シールしたPCRプレートを280 × gで10秒間遠心します。
2. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。
3. 各ウェルから、上清を45 µLずつ、新しいPCRプレートに移します。
4. AMPure XPをボルテックスして懸濁します。
5. 各ウェルにAMPure XPを81 µLずつ添加します。
6. シールし、2,200 rpmで1分間攪拌します。
7. 室温で5分間インキュベートします。
8. 280 × gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
9. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
10. 上清をすべて除去し、廃棄します。
11. 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ずつ添加します。
 - b. 30秒間待ちます。
 - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
12. **2回目**のビーズ洗浄をします。
13. 20 µLピペットで、残存するEtOHをすべて除去します。
14. 磁気スタンド上で2分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
15. 磁気スタンドから外します。
16. 各ウェルにRSBを17 µLずつ添加します。
17. シールし、2,700 rpmで1分間攪拌します。
18. 室温で2分間インキュベートします。
19. 280 × gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
20. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
21. 各ウェルから、上清を15 µLずつ、新しいPCRプレートに移します。

安全なストップポイント

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

ライブラリーのノーマライゼーション

このステップでは、ライブラリーを定量、ノーマライズした後、1つのプールにまとめ、1-plex濃縮または3-plex濃縮します。結果は、1つのライブラリー当たり200 ngにノーマライズされます。

消耗品

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

事前準備

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

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

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

手順

1. Qubit dsDNA BR Assay Kitでライブラリー1 μ Lの定量をします。
2. [オプション] Agilent 2100 Bioanalyzer Systemおよび DNA 1000 Kitでライブラリー1 μ Lの定量をします。
3. [RPIPライブラリー]
 - 1-plex濃縮の場合、1つの200 ngライブラリーを希釈して7.5 μ Lにします。
 - 3-plex濃縮の場合、3つの200 ngライブラリーを希釈して、それぞれ2.5 μ Lにします。
4. [Respiratory Virus Panelライブラリー]
 - 1-plex濃縮の場合、希釈していないライブラリー7.5 μ Lを、新しいPCRプレートの1個のウェルに移します。
 - 3-plex濃縮の場合、3つの200 ngライブラリーを希釈して、それぞれ2.5 μ Lにします。
5. [その他のライブラリー] ライブラリーを、次のとおり、RSBで希釈します。
 - 1-plex濃縮の場合、1つの200 ngライブラリーを希釈して7.5 μ Lにします。
 - 3-plex濃縮の場合、3つの200 ngライブラリーを希釈して、それぞれ2.5 μ Lにします。

6. [希釈したライブラリー] 新しいPCRプレートの1個のウェル内で、該当する数の200 ngライブラリーを混合します。

200 ngライブラリー数 (濃縮プレキシティ)	総重量 (ng)	総体積 (μL)
1	200	7.5
3	600	7.5

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

プローブのハイブリダイゼーション

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

消耗品

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

試薬について

- NHB2は保管中に沈殿することがあります。

事前準備

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

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

3. 予熱したNHB2を次のとおり混合します。
 - a. 10秒間のボルテックスを3回繰り返します。
 - b. ピペティングで完全に懸濁させます。再沈殿を防ぐため、使用時まで保温しておきます。
4. EHB2またはNHB2が結晶化あるいは混濁した場合は、透明になるまでボルテックスあるいはピペティングします。
5. 以下のHYBプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
 - 反応量を25 µLに設定します。
 - 95°Cで5分間
 - 1分間を18サイクル：
 - 初回サイクルは94°C
 - その後はサイクルごとに2°Cずつ下げます。
 - 58°Cで90分間
 - 58°Cで最長24時間保持します。

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

手順

1. 新しいPCRプレートの各ウェルに、以下の分量を**以下の記載順**に添加します。
 - 200 ngライブラリーまたは600 ngプール (7.5 µL)
 - NHB2 (12.5 µL)
 - 濃縮用オリゴ (2.5 µL)
 - EHB2 (2.5 µL)
2. ピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
3. 280 × gで3秒間遠心します。
EHB2により反応液が混濁する場合がありますが、これは正常です。
4. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、HYBプログラムを実行します。
5. 58°Cで90分間~24時間インキュベートします。
各ウェルの液量は25 µLです。

ハイブリダイズしたプローブのキャプチャー

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

消耗品

- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- EEW (Enhanced Enrichment Wash)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads 3)
- 1.7 mLマイクロチューブ
- 96ウェルPCRプレート (セミスカート付き) (2)
- Microseal 'B'粘着フィルム

事前準備

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

試薬	保管条件	説明
EE1	-25°C~-15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
EEW	-25°C~-15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
ET2	2°C~8°C	室温に戻し、ボルテックスして混合します。
HP3	-25°C~-15°C	室温で融解し、ボルテックスして混合します。
SMB3	2°C~8°C	30分間静置し室温に戻します。 ボルテックスおよび転倒混和します。

3. EEWを予熱したマイクロヒーティングシステムに入れます。保温します。
4. サーマルサイクラーを次のとおり設定します。
 - インキュベーションのオプションがある場合は、インキュベーションを58°Cに設定してください。
 - インキュベーションのオプションがない場合は、以下のIncubationプログラムを保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、70°Cに設定します。
 - 反応量を100 µLに設定します。
 - 58°Cで保持します。

手順

キャプチャー

1. シールしたPCRプレート¹を280 × gで10秒間遠心します。
2. SMB3をボルテックスして懸濁します。
3. 各ウェルにSMB3を62.5 μLずつ添加します。
4. ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。
5. 58°Cのサーマルサイクラーに入れ、15分間インキュベートします。プログラムを続行します。サーマルサイクラーは、キャプチャーと4回の洗浄の間、継続的に作動します。
6. 15分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a. 280 × gで10秒間遠心します。
 - b. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
7. 上清をすべて除去し、廃棄します。

1回目の洗浄

1. 磁気スタンドから外します。
2. 各ウェルに予熱したEEWを50 μLずつ添加します。
3. シールし、2,400 rpmで4分間攪拌します。
4. 未使用のEEWをマイクロヒーティングシステムに戻し、保温します。
5. プレートを58°Cのサーマルサイクラーに戻し、5分間インキュベートします。
6. 5分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a. 280 × gで3秒間遠心します。
 - b. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
7. 上清をすべて除去し、廃棄します。

2回目および3回目の洗浄

1. 磁気スタンドから外します。
2. 各ウェルに予熱したEEWを50 μLずつ添加します。
3. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
4. 未使用のEEWをマイクロヒーティングシステムに戻し、保温します。
5. プレートを58°Cのサーマルサイクラーに戻し、5分間インキュベートします。
6. 5分間のインキュベーション後、直ちに次の操作をします。
 - a. 280 × gで3秒間遠心します。
 - b. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。プログラムを続行します。
7. 上清をすべて除去し、廃棄します。
8. 3回目の洗浄で、ステップ1~7を繰り返します。

移動洗浄

1. 磁気スタンドから外します。
2. 各ウェルに予熱したEEWを50 μ Lずつ添加します。
3. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
4. 280 \times gで3秒間遠心します。
5. 各ウェルから、懸濁したビーズ溶液50 μ Lを新しいPCRプレートに移します。
このように新しいPCRプレートに移すことで、増幅の妨げとなり得る試薬の残存を最小限に抑えることができます。
6. シールし、280 \times gで3秒間遠心します。
7. 58°Cのサーマルサイクラーに戻し、5分間インキュベートします。
8. 5分間のインキュベーション後、直ちに磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
9. 上清をすべて除去し、廃棄します。
10. 20 μ Lピペットで、残存するEEWをすべて除去し、廃棄します。
11. 過度の乾燥を防ぐため、直ちに20ページの「溶出」に進みます。

溶出

1. 以下の分量を正確に混合し、Elution Master Mixを調製します。それぞれの分量に合計サンプル数を乗じてください。
 - EE1 (28.5 μ L)
 - HP3 (1.5 μ L)気泡が生じても正確にピペ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. Elution Master Mixをしっかりピペティングして混合し、室温に置いておきます。
3. プレートを磁気スタンドから取り外します。
4. 各ウェルにElution Master Mixを23 μ Lずつ添加します。
5. シールし、2,600 rpmで1分間攪拌します。
6. 室温で2分間インキュベートします。
7. 280 \times gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
8. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
9. 各ウェルから、上清を21 μ Lずつ、新しいPCRプレートに移します。
10. 各ウェルにET2を4 μ Lずつ添加します。
11. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
各ウェルの液量は25 μ Lです。

安全なストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間）。

濃縮ライブラリーの増幅

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

消耗品

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

事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

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

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

2. 以下のAMPプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
 - 反応量を50 µLに設定します。
 - 98°Cで30秒間
 - 以下を14サイクル：
 - 98°Cで10秒間
 - 60°Cで30秒間
 - 72°Cで30秒間
 - 72°Cで5分間
 - 10°Cで保持します。

手順

1. シールしたプレート を280 × gで10秒間遠心します。
2. PCRプレートの各ウェルにPPCを5 µLずつ添加します。
3. 各ウェルにEPMを20 µLずつ添加します。
4. シールし、2,000 rpmで1分間攪拌します。
5. 280 × gで10秒間遠心します。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、AMPプログラムを実行します。
プログラムの所要時間は計35分間程度で、各ウェルの液量は50 µLです。

安全なストップポイント

中断する場合は、2°C~8°Cで保管します（最長2日間）。または、サーマルサイクラーに載せたままにしておいてください（最長24時間）。

濃縮ライブラリーの精製

このステップでは、磁気ビーズを用いて濃縮ライブラリーを精製します。

消耗品

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

事前準備

1. 無水EtOHから80% EtOHを調製します。

手順

1. シールしたプレート 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. シールし、2,200 rpmで1分間攪拌します。
5. 室温で5分間インキュベートします。
6. 280 × gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
7. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
8. 上清をすべて除去し、廃棄します。

9. 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。
10. **2回目**のビーズ洗浄をします。
11. 20 μ Lピペットで、残存するEtOHをすべて除去します。
12. 磁気スタンド上で2分間風乾します。
13. 磁気スタンドから外します。
14. 各ウェルにRSBを32 μ Lずつ添加します。
15. シールし、2,600 rpmで1分間攪拌します。
16. 室温で2分間インキュベートします。
17. 280 \times gで10秒間遠心し、その後シールをはがします。
18. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
19. 各ウェルから、上清を30 μ Lずつ、新しいPCRプレートに移します。

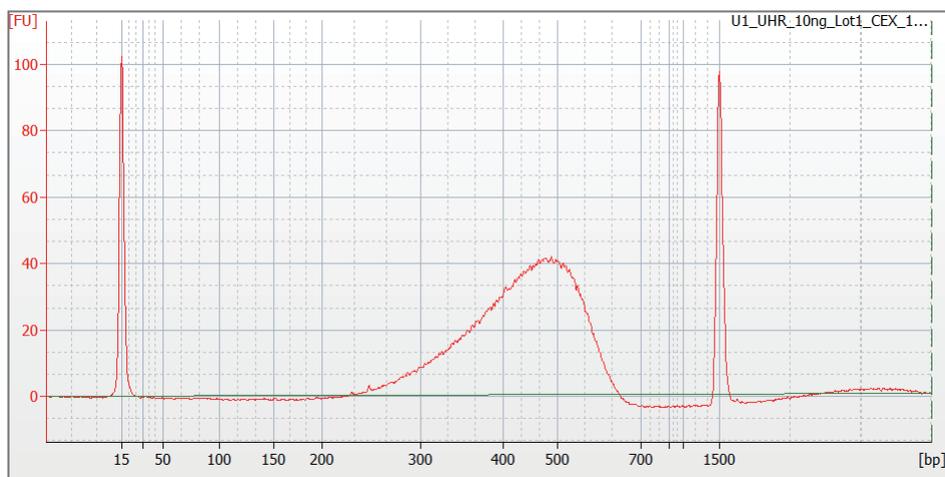
安全なストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、 -25°C ～ -15°C で保管します（最長7日間）。

濃縮ライブラリーのチェック

1. 以下の両方の方法を用いて、濃縮ライブラリーをチェックします。
 - Qubit dsDNA HS Assay kitで濃縮ライブラリー1 μ Lを解析し、ライブラリーの濃度（ng/ μ L）を定量します。
 - Agilent 2100 Bioanalyzer SystemおよびDNA 1000 Kitで濃縮ライブラリー1 μ Lを解析し、定性を行います。

図 1 Bioanalyzerからの出力例



ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップでは、ライブラリーを、NovaSeq 6000システム、NextSeq 500システム、あるいはNextSeq 550システムでの開始濃度に希釈します。開始濃度への希釈後に、ライブラリーは、変性できる状態かつ最終ローディング濃度に希釈できる状態となります。シーケンスにはペアエンドランを推奨します。インデックスリード当たりのサイクル数は10です。リード当たりのサイクル数はシーケンスシステムによって異なります。

- 該当する手法を用いて、ライブラリーまたはライブラリープールのモル濃度を求めます。
 - Bioanalyzerのみで定量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、以下の式によりモル濃度を算出します。Bioanalyzerにより求めた平均サイズと、Qubitにより求めた濃度を使用します。

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

- モル濃度を用いて、ライブラリーを使用システムの開始濃度に希釈するのに必要なRSBとライブラリーの量を算出します。

シーケンスシステム	開始濃度 (nM)	最終ローディング濃度 (pM)
NextSeq 550/NextSeq 500	20	0.8
NovaSeq 6000	0.6	120
MiniSeq [RPIPパネル]	2	2
MiSeq [RPIPパネル]	4	10

- RSBを用いて、それぞれのライブラリーを、使用システムの開始濃度に希釈します。希釈後の10 μL のライブラリーを1つのチューブにまとめ、ライブラリーをプールします。
- 使用システムの変性希釈手順に従って、ライブラリーを最終ローディング濃度に希釈します。

サポート情報

略語

略語	定義
CEX	Coding Exome Oligos
dsDNA	二本鎖DNA
EBLTL	Enrichment Bead-Linked Transposomes
EE1	Enrichment Elution Buffer 1
EEW	Enhanced Enrichment Wash
EHB2	Enrich Hyb Buffer 2
EPH3	Elute, Prime, Fragment High Concentration Mix
EPM	Enhanced PCR Mix
ET2	Elute Target Buffer 2
EtOH	エタノール
HP3	2 N NaOH
NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
PPC	PCR Primer Cocktail
RPIP	Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel
RSB	Resuspension Buffer
RVO	Respiratory Virus Oligos
SMB3	Streptavidin Magnetic Beads 3
SMM	Second Strand Marking Master Mix
ST2	Stop Tagment Buffer 2
TB1	Tagmentation Buffer 1
TWB	Tagment Wash Buffer
UD	ユニークデュアル

キットの内容と保管条件

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

項目	名称	当社カタログ番号
ライブラリー調製	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Samples)	20040536
	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Samples)	20040537
インデックス	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20027213
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20027214
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20042666
	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20042667
パネル	Illumina Exome Panel	20020183
	Respiratory Virus Oligos Panel v2	20044311
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Kit	Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) A	20047050
	Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) B	20046969
	Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) C	20047051
	Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) D	20047052

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

これらのイルミナ製品には、Agencourt AMPure XPは含まれていません。サプライヤーについては、[32ページの「補助消耗品」](#)をご覧ください。

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

Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EPH3	Elute, Prime, Fragment High Concentration Mix	透明	-25℃~-15℃	-25℃~-15℃
1	FSA	First Strand Synthesis Act D 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 DNA/RNA Prep — Tagmentation Beads

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

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Buffers

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

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation PCR Reagents

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

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment Beads + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	SMB3	Streptavidin Magnetic Beads 3	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment PCR + Buffers

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

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

Illumina cDNA Synthesis

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

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Beads

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

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation Buffers

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

Illumina DNA/RNA Prep — Tagmentation PCR Reagents

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

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment Beads + Buffers

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	ET2	Elute Target Buffer 2	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
2	SMB3	Streptavidin Magnetic Beads 3	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

Illumina RNA Fast Hyb Enrichment PCR + Buffers

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

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

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

Enrichment Panels（20020183、20044311、 20047050、20046969）

パネル名	数量	試薬	説明	出荷時	保管条件
Illumina Exome Panel	1	CEX	Coding Exome Oligos	-25°C~-15°C	-25°C~-15°C
Respiratory Virus Panel v2	1	RVO	Respiratory Virus Oligos	-25°C~-15°C	-25°C~-15°C
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel	1	RPIP	Respiratory Pathogen ID/AMR Panel	-25°C~-15°C	-25°C~-15°C

Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kits（RUO）

以下のキットについては、解析のためにBasespaceでExplifyソフトウェアアプリを使用してください。

Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit（RUO）A （96 Indexes, 96 Samples）カタログ番号：20047050

含まれる製品	カタログ番号	数量
Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation 96 Samples	20040537	1
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel + IDbyDNA; 32 enrichments in 3-plex format; 96 Samples	20046187	1
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation（96 Indexes）	20027213	1

Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) B (96 Indexes, 96 Samples) カタログ番号 : 20046969

含まれる製品	カタログ番号	数量
Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation 96 Samples	20040537	1
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel + IDbyDNA; 32 enrichments in 3-plex format; 96 Samples	20046187	1
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes)	20027214	1

Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) C (96 Indexes, 96 Samples) カタログ番号 : 20047051

含まれる製品	カタログ番号	数量
Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation 96 Samples	20040537	1
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel + IDbyDNA; 32 enrichments in 3-plex format; 96 Samples	20046187	1
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes)	20042666	1

Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel Target Enrichment Kit (RUO) D (96 Indexes, 96 Samples) カタログ番号 : 20047052

含まれる製品	カタログ番号	数量
Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation 96 Samples	20040537	1
Respiratory Pathogen ID/AMR Oligo Panel + IDbyDNA; 32 enrichments in 3-plex format; 96 Samples	20046187	1
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes)	20042667	1

消耗品および機器

本プロトコールは、本ガイドに記載されている消耗品および機器を用いて最適化と検証がなされています。別の消耗品および機器を使用する場合、同等の性能は保証されません。

補助消耗品

消耗品	サプライヤー
1.5 mLマイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
1.7 mLマイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
1.7 mLマイクロチューブ (RNaseフリー)	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µLピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µLピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µLピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
Eppendorf™ twin.tec™ PCRプレート96 (セミスカート付き、250 µL、PCRクリーン)	Eppendorf、カタログ番号：951020303
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent、カタログ番号：5067-1504
Agencourt AMPure XP (5 mL)	Beckman Coulter、カタログ番号：A63880
無水エチルアルコール (500 mL)	Sigma-Aldrich、カタログ番号：E7023
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad、カタログ番号：MSB1001
RNase/DNaseフリーのマルチチャンネル試薬リ ザーバー (ディスポーザブル)	VWR、カタログ番号：89094-658
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：Q32856
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：Q32850 またはQ32853
ヌクレアーゼフリー超純水	一般的なラボ用品サプライヤー

補助機器

機器	サプライヤー
10 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µL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シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent Technologies、カタログ番号： G2940CA
粘着シールローラー	一般的なラボ用品サプライヤー
次のサーマルサイクラーのいずれか。 <ul style="list-style-type: none"> • C1000 Touch 96-Deep Well Reaction Module (C1000 Touchとは別売り、必要に応じて) • C1000 Touch Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module (バンドルされたサーマルサイクラーコントローラーと反応モジュール) • T100 Thermal Cycler 	Bio-Rad、カタログ番号： <ul style="list-style-type: none"> • 1840197 • 1851197 • 1861096
マイクロサンプルインキュベーター	一般的なラボ用品サプライヤー
マイクロサンプルインキュベーター用1.5 mLチューブブロック	一般的なラボ用品サプライヤー
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号： AM10027
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
次のシェーカーのいずれか。 <ul style="list-style-type: none"> • BioShake iQ High-Speed Thermal Mixer • BioShake XP High-Speed Thermal Mixer 	Q Instruments、カタログ番号： <ul style="list-style-type: none"> • 1808-0506 • 1808-0505

テクニカルサポート

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

ウェブサイト：jp.illumina.com

電子メール：techsupport@illumina.com

イルミナテクニカルサポート電話番号

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

地域	フリーダイヤル	国際
フィリピン	+63 180016510798	
フィンランド	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
フランス	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
米国	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
ベトナム	+84 1206 5263	
ベルギー	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
香港 (中国)	+852 800 960 230	
マレーシア	+60 1800 80 6789	

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

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



イルミナ株式会社
東京都港区芝5-36-7
三田ベルジュビル22階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®