

TruSeq® DNA PCR-Free Library Prep

Reference Guide

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。

改訂履歴	3
はじめに	5
DNAインプットの推奨	6
追加リソース	8
はじめに	9
チップと手法	10
ライブラリー調製ワークフロー	11
プーリングの準備	12
DNAの断片化	13
末端修復 およびライブラリーサイズを選択	16
3' 末端のアデニル化	19
アダプターのライゲート	21
ライブラリーの検証	24
ライブラリーの基準化およびプール	27
補足情報	29
テクニカルサポート	39



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上を使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づくいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての指示を熟読せず、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を一切負わないものとします。

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, GSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, パンプキンオレンジ色および遺伝子エネルギーの流れをベースとしたデザインは、米国および/またはその他の国にあるIllumina, Inc. および/またはその関連会社の商標です。その他すべての名称、ロゴ、その他の商標の所有権は、各所有者に帰属します。

改訂履歴

パーツ番号	改訂	年月	変更内容
15036187	D	2015年6月	<p>キット内容を更新し、試薬の変更および、ボックスとチューブのパーツ番号を削除した</p> <p>CTAおよびCTLの容量を2.5 µlに修正した</p> <p>インラインコントロールDNAで表示するためのSAVを削除</p> <p>この文書の表題をリファレンスガイドに変更した</p> <p>ワークフロー図のデザインを変更した</p> <p>必要に応じて一部手順の名前の変更および手順の集約を行い、一貫性を高めた</p> <p>HSおよびLSのプロトコールオプションを単一のワークフローに集約した</p> <p>各セクションの先頭に消耗品の説明を簡単に記載した</p> <p>段階的な説明となるよう修正し、簡潔を期した</p> <p>現在使用されていないExperienced User Cardsへの参照を削除し、新しいプロトコールガイドおよびチェックリストへの参照を追加した</p> <p>BaseSpace リソースの参照先をヘルプセンターに変更した</p>
15036187	C	2014年12月	<p>キットの名前を「サンプル」調製から「ライブラリー」調製に変更した</p> <p>サンプル、ライブラリー、プール、およびランを整理するためのBaseSpace®への参照を追加した</p> <p>各手順の最初と最後の例以外で、プレートの名前（IMPプレートなど）を削除した</p> <p>ビーズの精製の手順を修正し、サンプル風乾前のEtOHを削除した</p> <p>LSプロトコールで、各サーマルサイクラーのインキュベーション前に、遠心の手順を追加した</p> <p>ヒートインキュベーションの手順にウェルの容量を追加した</p> <p>プーリングの準備セクションを更新した</p> <p>追加リソースを更新した</p> <p>表目次を削除した</p> <p>SDSのリンク先を support.illumina.com/sds.htmlに変更した</p>

パーツ番号	改訂	年月	変更内容
15036187	B	2013年11月	<p>インキュベータ1 IMPをインキュベータIMPに変更した</p> <p>HSプロトコール</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ DCT作製の手順を修正し、DCTプレートがHSPプレートであることを明確にした ・ インキュベート後の遠心手順を移動した <p>EUCおよびLTFを統合し、プロトコールごとに1つの文書にした</p> <p>『頭文字』、『キット内容』、『消耗品および装置』、および『インデックスアダプターシーケンス』を含む『補足情報』の付録を作成した</p> <p>『ベストプラクティス』の章をイルミナのウェブサイトの内容への参照に変更した</p> <p>『アダプターオプション』および『プーリングガイドライン』の章を『TruSeq Sample Preparation Pooling Guide』（パーツ番号；15042173）を参照するようにに変更した</p> <p>『ガイドラインの使い方』を削除した</p>
15036187	A	2013年1月	最初のリリース

はじめに

本プロトコールでは、イルミナ株式会社® TruSeq® DNA PCR-Free Library Prep kitsに付属の試薬を使用して、最大96の独自にインデックスされたゲノムDNA (gDNA) のペアエンドライブラリーを調製する方法について説明します。本プロトコールの目的は、アダプターシーケンスをDNA断片の末端に追加して、インデックスされたシングルリードまたはペアエンドのシーケンスライブラリーを作製することです。

TruSeq DNA PCR-Free Library Prepプロトコールにより、以下が実現されます。

- ▶ ワークフローの合理化
 - ・ 試薬容器およびピペット操作を削減らすマスターミックス試薬
 - ・ シングルリード、ペアエンド、およびインデックスの調製に対するユニバーサルアダプター
- ▶ 全ゲノムを最適に剪断してリシーケンスする350 bpおよび550 bpインサートサイズワークフロー
- ▶ 各キットに含まれる、ビーズを基にしたサイズ選択試薬
- ▶ ローサンプル (LS) およびハイサンプル (HS) 処理用のオプション付きシングルワークフロー
- ▶ 低スループット (LT) および高スループット (HT) キット構成
- ▶ 高スループット
 - ・ アダプタープレートにより、デュアルインデックスされた96のDNAサンプルの同時調製が可能
 - ・ 標準的な96ウェルプレートに最適化された容量
- ▶ 高度なトラブルシューティング
 - ・ クオリティ制御用に内蔵されたプロセス制御チェック
- ▶ すべてのサンプルを標識するインデックスアダプター
 - ・ 追加のアダプターおよびプライマーは不要
 - ・ 各TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitには、シーケンス用に最大24個のサンプルを調製することが推奨されるアダプターインデックスチューブが含まれます。キットAおよびBの併用で、最大24サンプルのプーリングが可能です
 - ・ TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kitには、96の独自にインデックスされたサンプルを手動または自動で調製するように設計された、96の独自にインデックスされたアダプターの組み合わせを有する96ウェルプレートが含まれています。

本プロトコールは、インデックスしない場合、またはインデックスプーリング量が少ない場合にも適用です。作製されるライブラリーは、クラスター形成を可能にするPCR増幅を必要としません。

DNAインプットの推奨

ベストな結果を得るために、インプットに関する以下の推奨事項に従ってください。ライブラリー調製を行う前に、インプットgDNAを定量してgDNAの品質を評価してください。

- ▶ 350 bpインサートサイズの場合は1 µgのインプットgDNAを使用します。
- ▶ 550 bpの場合は2 µgのインプットgDNAを使用します。
- ▶ インプットの量が指定された量よりも少ないと、収量が低くなり、重複する割合が高くなります。

インプットDNAの定量

以下の推奨事項に従ってインプットDNAを定量してください。

- ▶ ライブラリー調製の成否は、正確に定量されたインプットDNA量を使用しているかどうかによって左右されます。複数の定量手法を用いて結果を検証してください。
- ▶ 定量には、QubitまたはPicoGreenなどの蛍光定量ベースの定量法を使用します。
- ▶ 蛍光色素のインターカレーションに依存するDNA定量方法は二本鎖DNAのみを検出し、余分な核酸の影響を受けにくくなっています。
- ▶ NanoDropなどスペクトラムベースの方法ではヌクレオチドも検出され、gDNAの測定が不正確になるおそれがあるため使用しないでください。
- ▶ 定量手法は正確なピペティングによって左右されます。ピペットは性能仕様で定められている容量の極限值では使用しないでください。ピペットが補正されていることを確認してください。

DNA品質の評価

DNA品質の評価には、260 nmでの吸光度測定が一般的に使用されます。

- ▶ 260 nmと280 nmでの吸光度の比率が、サンプル純度を示すものとして使用されます。1.8~2.0の値は比較的純度の高いDNAを示しています。
- ▶ RNAまたはヌクレオチドなどの核酸の小断片があることによって、260 nmと280 nmでの吸光度は精度が落ちることがあります。
- ▶ コンタミネーションが起きないように、サンプルの抽出は慎重に行ってください。

インラインコントロールDNA

CTE (End Repair Control) 試薬、CTA (A-Tailing Control) 試薬、およびCTL (Ligation Control) 試薬には、それぞれERP 2 (End Repair Mix 2)、ATL (A-Tailing Mix)、およびLIG 2 (Ligation Mix 2) の酵素活性のコントロールとして使用されるDNA断片が含まれています。各インラインコントロールには、特異的酵素活性の成否がわかるように設計された二本鎖DNA断片が含まれています。

コントロール分子は末端の設計を介して作用します。プロトコール中の対応する手順に進む前に、コントロールを反応液に加えます。コントロールの末端構造は、この手順を通らなかつたDNA分子の末端構造にマッチします。手順に成功した場合、コントロール分子は修飾されてライブラリー作製の下流反応に加えられる結果、シーケンスデータが得られます。手順に失敗した場合、コントロール分子はそのプロセスを進まないため、シーケンスデータは発生しません。

表1 インラインコントロール機能

試薬	機能	コントロール	コントロール DNA末端の構造
ERP 2	末端修復：3' →5' のエキソヌクレアーゼ活性および5' →3' のポリメラーゼ活性により平滑末端断片を生成する	End Repair Control 1*	一端は5' オーバーハング、他端は3' オーバーハング
ERP 2	末端修復：下流のライゲーションのために必要とされる5' -リン酸基を付加する	End Repair Control 2*	5' -OH基の平滑末端
ATL	Aテーリング：3' 末端にA塩基オーバーハングを付加することにより、アダプターと適合する断片を作製し、セルフライゲーションを防ぐ	A-Tailing Control	5' -リン酸基の平滑末端
LIG 2	ライゲーション：3' 末端T塩基オーバーハングアダプターを、3' 末端A塩基オーバーハングインサートに結合させる	Ligation Control	3' 末端にA塩基が1塩基分オーバーハング

*End Repair Control 1およびEnd Repair Control 2は、End Repair Control試薬に含まれる別々のコントロールです。

インラインコントロールは、様々なサイズのライブラリーインサートに用いることができます。各試薬は約150~850 bpから100 bp単位ずつ増やして利用できます各コントロール分子は、機能およびサイズの面で特異的なDNAシーケンスを有しています。サンプル調製ライブラリーでは、サイズ選択手順がA塩基テーリングの前にあるため、CTAおよびCTLコントロールが広いサイズ分布を示す一方で、CTE1およびCTE2コントロールは狭いサイズ分布を示します。

インラインコントロールは、トラブルシューティングを目的としており、特異的モードの失敗を特定するのに有益ですが、ライブラリーからシーケンスデータが生成されない場合は有益ではありません。コントロールの使用は選択可能で、同量のRSBに代えることができます。

追加リソース

以下の文書は、イルミナのウェブサイトからダウンロードできます。

リソース	内容
『TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Protocol Guide』 (パーツ番号 : 15075699)	プロトコル取扱説明書のみ提供しています。このプロトコルガイドは経験豊富なユーザー用です。
『TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Checklist』 (パーツ番号 : 15075700)	プロトコル手順のチェックリストを提供しています。このチェックリストは経験豊富なユーザー用です。
『Dual Index Sequencing with TruSeq HT Library Prep』 (パーツ番号 : 15059916)	TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kitを使用する場合の、デュアルインデックスシーケンスの調製のためのガイドラインを提供しています。
『TruSeq Library Prep Pooling Guide』 (パーツ番号 : 15042173)	バランスの取れたインデックスの組み合わせを要するイルミナシーケンサーシステムのライブラリーを調製するためのTruSeqプーリングガイドラインを提供しています。ライブラリーの調製を開始する前にこのガイドを参照してください。
『Illumina Experiment Manager Guide』 (パーツ番号 : 15031335) および 『IEM TruSeq DNA, RNA, or ChIP Quick Reference Card』 (パーツ番号 : 15037152)	イルミナシーケンサーシステムと分析ソフトウェア用の適切なサンプルシートの作成および編集、ならびにサンプルプレートのパラメータ記録に関する情報を提供しています。
BaseSpaceヘルプ (help.basespace.illumina.com)	サンプル、ライブラリー、プール、シーケンスランを1つの環境で整理することもできるBaseSpace®シーケンスデータ分析ツールに関する情報を提供しています。

イルミナのウェブサイトアクセスしTruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep KitサポートページまたはTruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kitサポートページを閲覧してください。要件および互換性、追加文書、ソフトウェアのダウンロード、オンライントレーニング、よくある質問、およびベストプラクティスについて記載しています。

はじめに

本章では、TruSeq DNA PCR PCR-Free Library Prepプロトコールについて説明します。

- ▶ 記載された順序でプロトコールに従い、指定された量およびインキュベーションパラメーターを用います。
- ▶ 本プロトコールでは、オプションで異なるタイプのプレートと容器として用いる、シングルワークフローについても説明しています。
 - ・ 各オプションの違いは、[HS] または [LS] で示します。
 - ・ 使用している容器の説明に従ってください。
 - ・ いずれのオプションでも同等の結果が得られます。ただし、[HS] ではサンプル間でより一貫性のある結果が得られます。
 - ・ プロトコールオプションの特徴的な要素は以下のとおりです。

表2 ワークフローオプション

ワークフローの識別子	HS	LS
LTキット：一度に処理されるサンプル数	インデックスアダプターチューブを用いて24超*	インデックスアダプターチューブを用いて24以下*
HTキット：一度に処理されるサンプル数	インデックスアダプタープレートを用いて24超	インデックスアダプタープレートを用いて24以下
プレートタイプ	96ウェルハードシェルPCR 96ウェルmidi	96ウェル0.3 ml PCR 96ウェルmidi
インキュベーション装置	マイクロヒーティングシステム	96ウェルサーマルサイクラー
混合手法	マイクロプレートシェーカー	ピペッティング

*各TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitには、最大24サンプルを調製するのに十分な量の試薬が含まれています。TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit AおよびBを併用した場合は、各キットに含まれている12の異なるインデックスを使用して、最大24サンプルをブリーディングすることができます。

- ▶ 実験に進む前にベストプラクティスを閲覧します。イルミナ株式会社ウェブサイトのTruSeq DNA PCR-Free Library Prepベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページの追加リソースを参照してください。
- ▶ 実験に進む前に、キットの内容を把握し、必要な装置および消耗品が揃っていることを確認します。詳細は、29ページの補足情報を参照してください。

チップと手法

プロトコールに安全な停止ポイントが明記されていない場合は、すぐに次の手順へ進みます。

クロスコンタミネーションの防止

- ▶ サンプルを追加または移動する場合は、**それぞれのサンプル間のチップ**を交換してください。
- ▶ アダプターまたはプライマーを追加する場合は、**各行および各カラム間のチップ**を交換してください。
- ▶ 作業台から使用しないインデックスアダプターチューブを取り除いてください。

プレートの密封

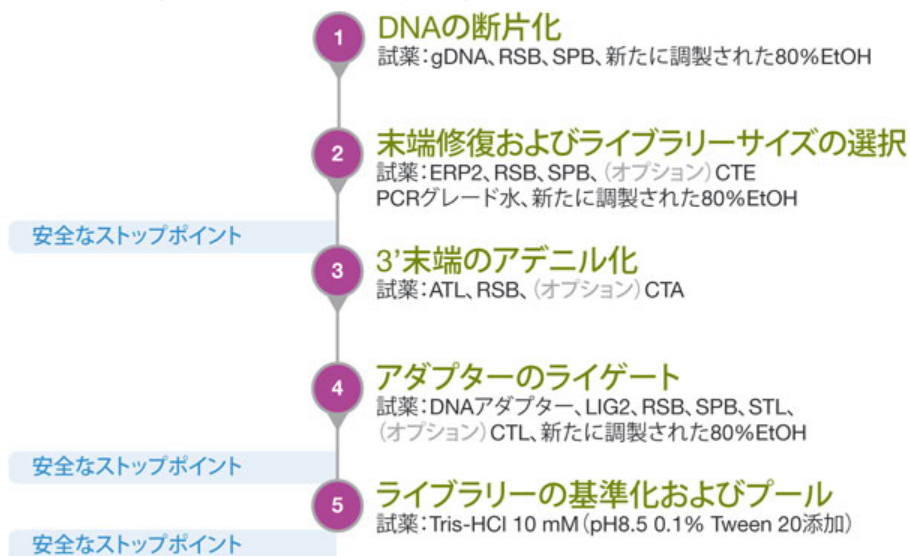
- ▶ プロトコールの以下の手順に進む前に必ず96ウェルプレートを密封してください。
 - ・ 攪拌手順
 - ・ 遠心手順
 - ・ サーマルサイクリング手順
- ▶ 粘着シールをプレートを覆うように貼り、ゴムローラーで密封してください。
- ▶ Microseal「B」粘着シールは、-40° Cから110° Cで有効で、スカート付きまたはセミスカート付きのPCRプレートに適合します。
- ▶ Microseal「A」粘着フィルムは、サーマルサイクリングに有効で、96ウェルすべてを使用しない場合には簡単に切り取れます。

プレート移動

- ▶ プレート間の容量を移す場合、1つのプレートの各ウェルから他のプレートの対応するウェルに規定された容量を移します。

ライブラリー調製ワークフロー

図1 TruSeq DNA PCR-Free Library Prepワークフロー



プーリングの準備

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、IEMまたはBaseSpaceを使用してサンプルに関する情報を記録します。

- ▶ IEMを使用して、イルミナのシーケンサーシステムと分析ソフトウェアのサンプルシートの作成および編集を行います。
- ▶ BaseSpace調製タブを使用して、イルミナシーケンサーシステムと分析ソフトウェアのサンプル、ライブラリー、プール、およびランを整理します。

バランスの取れたインデックスの組み合わせを要するイルミナシーケンサーシステムのライブラリーを調製する場合には、『*TruSeq Library Prep Pooling Guide*』（パーツ番号：15042173）で予定している手順を検証してください。

DNAの断片化

このプロセスでは、gDNAを最適に断片化する方法を説明します。350 bp、または550 bp インサートサイズCovaris剪断では、3' または5' 末端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

- ▶ gDNAサンプル
 - ・ インサートサイズ
 - が350 bpの場合は、サンプルあたり1 µg、
 - 550 bpの場合は、サンプルあたり 2 µg
- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SPB (サンプル精製ビーズ)
- ▶ バーコードラベル
 - ・ CFP (Covaris断片化プレート)
 - ・ CSP (クリーンアップ剪断DNAプレート)
 - ・ DNA (DNAプレート)
 - ・ IMP (Insert Modification Plate)
- ▶ 新たに調製された80%エタノール (EtOH)
- ▶ 以下の容器から選択してください：
 - ・ [HS] 96ウェルmidiプレート (3) および96ウェルハードシェル0.3 ml PCRプレート (1)
 - ・ [LS] 96ウェル0.3 ml PCRプレート、セミスカート付きまたはスカートレス (4)
- ▶ Covarisチューブ (1サンプルにつき1本)
- ▶ Microseal 「B」 粘着シール

試薬について

- ▶ 試薬を使用する前に毎回SPBをボルテックスしてください。
- ▶ ビーズが均等に分散されるようにSPBを頻繁にボルテックスします。
- ▶ 溶液には粘性があるためSPBを吸引および分配する際はゆっくり行ってください。

調製

- 1 以下の消耗品を準備してください。

アイテム	保存	説明
RSB	-25° C~-15° C	室温で融解します。 最初の融解後は2° C~8° C
SPB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。 後でプロトコールで使用するために室温で保持します。

- 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。
- 3 [HS] ストロボスコープを使用してマイクロプレートシェイカーを較正し、1800 rpm に設定します。
- 4 以下のとおりバーコードラベルをプレートに貼ります。
 - ・ DNA (midiまたはPCRプレート)
 - ・ CFP (ハードシェルPCRまたはPCRプレート)
 - ・ CSP (midiまたはPCRプレート)

- ・ IMP (midiまたはPCRプレート)

手順

gDNAの基準化

- 1 蛍光定量を使用した手法で、gDNAを定量します。
- 2 gDNAサンプルを、最終量が55 μ lになるように、DNAプレートでRSBを用いて基準化します。
 - ・ インサートサイズが350 bpの場合は20 ng/ μ l
 - ・ インサートサイズが550 bpの場合は40 ng/ μ l
- 3 以下のとおり、しっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 4 以下のとおり遠心します。
 - ・ [HS] 280 xgで1分間遠心します。
 - ・ [LS] 軽く遠心します。

DNAの断片化

- 1 DNAサンプル52.5 μ lを別のCovarisチューブに移します。
CFPプレートのウェルを使用して、Covarisチューブを直立させてください。
- 2 280 xgで5秒間遠心します。
- 3 以下のCovarisの設定で、DNAを断片化します

表3 350 bpインサートの設定

Covarisの設定	M220	S220	S2	E210
デューティー比 (%)	20	5	10	
強度	-	-	5.0	
ピーク放射電力 (W)	50	175	23	14
バーストあたりのサイクル	200			
持続時間 (秒)	65	50	45	
モード	-	周波数掃引		
温度 (°C)	20	5.5~6		

表4 550 bpインサートの設定

Covarisの設定	M220	S220	S2	E210
デューティー比 (%)	20	5	10	
強度	-	-	2.0	
ピーク放射電力 (W)	50	175	9	7
バーストあたりのサイクル	200			
持続時間 (秒)	45	25	45	
モード	-	周波数掃引		
温度 (°C)	20	5.5~6		

- 280 xgで5秒間遠心します。
- 各CovarisチューブからCSPプレートの対応するウェルに上清50 µlを移します。

断片化されたDNAの精製

- 十分に分散されるまでSPBをボルテックスします。
- 各ウェルにSPB 80 µlを添加し、その後しっかり混ぜ合わせます。
 - [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
- 室温で5分間インキュベートします。
- [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します (~8分)。
- 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 以下のとおり洗浄を2回行います。
 - 各ウェルに新しく調製した80%エタノール (EtOH) 200 µlを添加します。
 - 磁気スタンドの上で30秒間インキュベートします。
 - 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 20 µlのピペットを使用して、各ウェルから残っているEtOHを取り除きます。
- 磁気スタンド上で5分間風乾させます。
- 各ウェルにRSB 52.5 µlを添加します。
- 磁気スタンドから取り外し、その後しっかり混ぜ合わせます。
 - [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
- 室温で2分間インキュベートします。
- [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します (2~5分間)。
- 上澄み液50 µlを、IMPプレートの対応するウェルに移します。

末端修復 およびライブラリーサイズを選択

このプロセスでは、End Repair Mix 2を使用して、断片化によって生じた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。末端修復の後に、割合の異なるSPB（サンプル精製ビーズ）を用いて適切なライブラリーサイズが選択されます。

消耗品

- ▶ ERP2またはERP3（End Repair Mix）
- ▶ RSB（Resuspension Buffer）
- ▶ SPB（サンプル精製ビーズ）
- ▶ （オプション）CTE（End Repair Control）
- ▶ バーコードラベル
 - ・ ALP（Adapter Ligation Plate）
 - ・ CEP（クリーンアップ末端修復プレート）
- ▶ 15 mlコニカルチューブ
- ▶ 新たに調製された80%エタノール（EtOH）
- ▶ PCRグレード水
- ▶ 以下の容器から選択してください：
 - ・ [HS] 96ウェルmidiプレート（2）
 - ・ [LS] 96ウェル0.3 ml PCRプレート、セミスカート付きまたはスカートレス（2）
- ▶ Microseal「B」粘着シール

試薬について

- ▶ キットには、ERP2またはERP3が入っています。
- ▶ CTEの使用はオプションです。RSBで代用することもできます。
- ▶ 試薬を使用する前に毎回SPBをボルテックスしてください。
- ▶ ビーズが均等に分散されるようにSPBを頻繁にボルテックスします。
- ▶ 溶液には粘性があるためSPBを吸引および分配する際はゆっくり行ってください。

調製

- 1 以下の消耗品を準備してください。

アイテム	保存	説明
ERP2またはERP3	-25° C~-15° C	室温で融解し、氷の上に置いてください。 使用後は保管場所に戻してください。
CTE	-25° C~-15° C	室温で融解し、氷の上に置いてください。
RSB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。
SPB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。

- 2 [HS] マイクロヒーティングシステムを30° Cに予熱します。

- 3 [LS] サーマルサイクラーに以下のERP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に設定します。
 - ・ 30° Cで30分間
 - ・ 4° Cで保持
- 4 以下のとおりバーコードラベルをプレートに貼ります。
 - ・ ALP (midiまたはPCRプレート)
 - ・ CEP (midiまたはPCRプレート)

手順

オーバーハングの変換

- 1 CTEを600 x gで5秒間遠心します。
- 2 各ウェルにCTE 10 µlを添加します。
- 3 ERP2またはERP3を600 x gで5秒間遠心します。
- 4 各ウェルにERP2またはERP3を40 µl添加し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 5 [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 6 以下のとおりインキュベートします。
 - ・ [HS] 予熱し蓋を閉じた30° Cのマイクロヒーティングシステムに30分間置き、その後氷の上に置きます。
 - ・ [LS] サーマルサイクラーの上に置き、ERPプログラムを実施します。各ウェルには100 µl入っています。

大きいDNA断片の除去

- 1 十分に分散されるまでSPBをボルテックスします。
- 2 PCRグレード水で、SPBを末端修復サンプル100 µlあたり160µlに希釈します。
 - ・ 6サンプル以下を処理する場合、新しい1.7 ml微量遠心分離チューブを使用します。
 - ・ 6サンプルを超えて処理する場合、新しい15 mlコニカルチューブを使用します。
 以下の計算式を用い、多くのサンプルについて15%の過剰量を含む量を決定します。

表5 350 bpインサートサイズ用の希釈されたビーズミックス

	計算式	12サンプルあたりの量の例	ユーザーの計算
SPB	サンプル数 X 109.25 µl	1311 µl	
PCRグレード水	サンプル数 X 74.75 µl	897 µl	

表6 550 bpインサートサイズ用の希釈されたビーズミックス

	計算式	12サンプルあたりの量の例	ユーザーの計算
SPB	サンプル数 X 92 µl	1104 µl	
PCRグレード水	サンプル数 X 92 µl	1104 µl	

- 3 十分に分散されるまで希釈されたSPBをボルテックスします。

- 4 希釈されたSPB160 μ lを、各ウェルに添加し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 5 室温で5分間インキュベートします。
- 6 [HS] 280 xgで1分間遠心します。
- 7 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します（～5分）。
- 8 上清250 μ lをCEPプレートの対応するウェルに移します。
- 9 残留している希釈SPBを廃棄します。

小さいDNA断片の除去

- 1 希釈していないSPBを、十分に分散されるまでボルテックスします。
- 2 希釈していないSPB 30 μ lを各ウェルに添加し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 3 室温で5分間インキュベートします。
- 4 [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 5 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します（～5分）。
- 6 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 7 以下のとおり洗浄を2回行います。
 - a 各ウェルに新しく調製した80%エタノール (EtOH) 200 μ lを添加します。
 - b 磁気スタンドの上で30秒間インキュベートします。
 - c 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 8 20 μ lのピペットを使用して、各ウェルから残っているEtOHを取り除きます。
- 9 磁気スタンド上で5分間風乾させます。
- 10 各ウェルにRSB 17.5 μ lを添加します。
- 11 磁気スタンドから取り外し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 12 室温で2分間インキュベートします。
- 13 [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 14 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します（～5分）。
- 15 上澄み液15 μ lを、ALP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、プレートを密封し、 -25°C ～ -15°C で最長7日間保管してください。

3' 末端のアデニル化

アダプターライゲーションの反応の間にDNA断片同士が互いにライゲートするのを防ぐ目的で、平滑化された3' 末端に1塩基の「A」ヌクレオチドを添加します。これに対応する形でアダプターの3' 末端に相補的にオーバーハングして存在する1塩基の「T」ヌクレオチドによって、アダプターと断片がライゲートします。この方法により、キメラ（連結したテンプレート）の生成率が低減されます。

消耗品

- ▶ ATLまたはATL2 (A-Tailing Mix)
- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ (オプション) CTA (A-Tailing Control)
- ▶ [HS] Microseal 「B」 粘着シール

試薬について

- ▶ キットにはATLまたはATL2が入っています。
- ▶ CTAの使用はオプションです。RSBで代用することもできます。

調製

- 1 以下の消耗品を準備してください。

アイテム	保存	説明
ATLまたはATL2	-25° C~-15° C	室温で融解します。 使用後は保管場所に戻してください。
CTA	-25° C~-15° C	室温で融解し、氷の上に置いてください。
RSB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。

- 2 [HS] 2つのマイクロヒーティングシステムを予熱します。システム1は37° C、システム2は70° Cに予熱します。
- 3 [LS] サーマルサイクラーに以下のATAIL70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に設定します。
 - ・ 37° Cで30分間
 - ・ 70° Cで5分間
 - ・ 4° Cで5分間
 - ・ 4° Cで保持

手順

- 1 CTAを600 xgで5秒間遠心します。
- 2 各ウェルにCTA 2.5 µlを添加します。
- 3 ATLまたはATL2を600 xgで5秒間遠心します。
- 4 各ウェルにATLまたはATL2 12.5 µlを添加し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。

5 以下のとおりインキュベートします。

[HS]

- a 37° Cのマイクロヒーティングシステムに蓋を閉じて30分間置きます。
- b 70° Cのマイクロヒーティングシステムに移し、蓋を閉じて5分間置きます。
- c 氷の上に5分間置きます。

[LS]

- a サーマルサイクラーの上に置き、ATAIL70プログラムを実行します。各ウェルには30 μ l含まれています。

アダプターのライゲート

このプロセスでは、複数のインデックスアダプターをDNA断片の末端にライゲートし、フローセルへのハイブリダイゼーション用に調製します。

消耗品

- ▶ DNAアダプター (チューブまたはDAP)
- ▶ LIG2 (Ligation Mix 2)
- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SPB (サンプル精製ビーズ)
- ▶ STL (Stop Ligation Buffer)
- ▶ (オプション) CTL (Ligation Control)
- ▶ バーコードラベル
 - ・ CAP (クリーンアップALPプレート)
 - ・ DAP (DNAアダプタープレート)
 - ・ TSP1 (標的サンプルプレート)
- ▶ 新たに調製された80%エタノール (EtOH)
- ▶ 以下の容器から選択してください：
 - ・ [HS] 96ウェルmidiプレート (1) および96ウェルハードシェル0.3 ml PCRプレート (1)
 - ・ [LS] 96ウェル0.3 ml PCRプレート、セミスカー付きまたはスカーレス (2)
- ▶ [HS] Microseal 「B」 粘着シール

試薬について

- ▶ CTLの使用はオプションです。RSBで代用することもできます。
- ▶ 手順書で指示されるまで、保場場所からLIG2を取り出さないでください。
- ▶ LIG2は使用后直ちに保場場所に戻してください。
- ▶ 試薬を使用する前に毎回SPBをボルテックスしてください。
- ▶ ビーズが均等に分散されるようにSPBを頻繁にボルテックスします。
- ▶ 溶液には粘性があるためSPBを吸引および分配する際はゆっくり行ってください。

調製

- 1 以下の消耗品を準備してください。

アイテム	保存	説明
CTL	-25° C~-15° C	室温で融解します。 使用後は保管場所に戻してください。
DNAアダプター	-25° C~-15° C	室温で10分間融解します。 使用後は保管場所に戻してください。 DAPIに対しては、凍結融解サイクルを最大4回行うことができます。
RSB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。

アイテム	保存	説明
STL	-25° C~-15° C	室温で融解します。 使用後は保管場所に戻してください。
SPB	2° C~8° C	室温になるよう30分間放置します。

- [HS] マイクロヒーティングシステムを30° Cに予熱します。
- [LS] サーマルサイクラーに以下の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に設定します。
 - ・ 30° Cで10分間
 - ・ 4° Cで保持
- 以下のとおりバーコードラベルをプレートに貼ります。
 - ・ CAP (midiまたはPCR)
 - ・ TSP1 (ハードシェルPCRまたはPCR)

手順

インデックスアダプターの追加

- [HTキット] DAPからテープシールを剥がします。
- 以下のとおりDNAアダプターを遠心します。

試薬	速度	時間
アダプターチューブ	600 x g	5秒間
DAP	280 x g	1分間

- [HTキット] 以下のとおりDAPを準備してください。
 - プラスチックカバーを外します。同時にすべてのプレートを処理しない場合は、カバーは取って置いてください。
 - DAPバーコードを貼ります。
- CTLを600 x gで5秒間遠心します。
- 25° C~-15° Cの貯蔵庫からLIG 2を取り出します。
- 以下の試薬を記載の順序で各ウェルに添加し、その後しっかり混ぜ合わせます。

試薬	容量 (μL)
CTL	2.5
LIG2	2.5
DNAアダプター	2.5

- ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
- 280 x gで1分間遠心します。
 - 以下のとおりインキュベートします。
 - ・ [HS] 30° Cのマイクロヒーティングシステムに蓋を閉じて10分間置き、その後氷の上に置きます。

- ・ [LS] 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。各ウェルには37.5 μ l入っています。
- 9 STLを600 x gで5秒間遠心します。
 - 10 各ウェルにSTL 5 μ lを添加し、その後しっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。
 - 11 [HS] 280 x gで1分間遠心します。

ライゲートした断片の精製

- 1 十分に分散されるまでSPBをボルテックスします。
- 2 **Round1**の容量を用いて、手順2aから2mを実施します。
 - a 各ウェルにSPBを添加し、その後しっかり混ぜ合わせます。

	Round1	Round2
SPB	42.5 μ l	50 μ l

 - [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
 - b 室温で5分間インキュベートします。
 - c [HS] 280 x gで1分間遠心します。
 - d 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します（2～5分間）。
 - e 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
 - f 以下のとおり2回洗浄します。
 - 各ウェルに新しく調製した80%エタノール（EtOH）200 μ lを添加します。
 - 磁気スタンドの上で30秒間インキュベートします。
 - 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
 - g 20 μ lのピペットを使用して、各ウェルから残っているEtOHを取り除きます。
 - h 磁気スタンド上で5分間風乾させます。
 - i 各ウェルにRSBを添加します。

	Round1	Round2
RSB	52.5 μ l	22.5 μ l
 - j 磁気スタンドから取り外し、その後しっかり混ぜ合わせます。
 - [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
 - k 室温で2分間インキュベートします。
 - l [HS] 280 x gで1分間遠心します。
 - m 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置します（2～5分間）。
- 3 上清50 μ lをCAPプレートの対応するウェルに移します。
- 4 新しいプレートで、手順2aから2mを、**Round2**の容量で繰り返します。
- 5 上澄み液20 μ lを、TSP1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、プレートを密封し、-25° C～-15° Cで最長7日間保管してください。

ライブラリーの検証

ライブラリーの品質管理分析および定量化のために以下の手順を実行してください。

ライブラリーの定量

イルミナシーケンスプラットフォーム上で最高品質のデータを取得するには、フローセルのすべてのレーンにわたって、最適な濃度でクラスターを作成することが重要です。クラスター密度を最適化するには、DNAライブラリーの正確な定量が必要です。qPCRを使用してライブラリーを定量してください。

- ▶ TruSeq DNA PCR PCR-Free Library Prepライブラリーの定量は、33ページの消耗品および装置。
- ▶ qPCR以外の方法では、両端にアダプターがなく、クラスターを形成しない分子が定量されます。PCR濃縮がないためにこうした非クラスター分子がより多く存在する可能性があり、qPCR以外の手法による定量は不正確なものとなります。

以下の改変をしたKAPA標準液 (www.kapabiosystems.com) を用い、イルミナシーケンスプラットフォーム技術データシート用のKAPAライブラリー定量キットに記載されているqPCR取扱説明書に従ってください。

イルミナシーケンスプラットフォーム技術データシート用のKAPAライブラリー定量キットは、Kapa Biosystemsウェブサイト (www.kapabiosystems.com) からダウンロードできます。

- ▶ ライブラリー希釈ステップではオリジナルライブラリー保存液 2 μ l以上を用い、正確かつ再現性のある定量を確実にします。
- ▶ 定量精度を評価するために、最初の希釈されたライブラリー2 μ l以上を用いた2つのさらに独立した（連続していない）1:10,000希釈および1:20,000希釈を実施します。



注記

少量の取り扱いガイダンスについては、ベストプラクティスに記載されているHandling Liquids（液体の取り扱い）を参照してください。イルミナのウェブサイトのTruSeq DNA PCR PCR-Free Library Prepベストプラクティスに関する詳細は8ページの追加リソースを参照してください。

各ライブラリーの濃度は、表7および表8に示すとおりに計算されます。

表7 350 bpライブラリーの濃度の計算

希釈係数	qPCR装置で計算した濃度 (pM) *		希釈したライブラリーの平均濃度 (pM)	希釈したライブラリーのサイズ調整濃度 (pM)	未希釈ライブラリー (pM) *	未希釈ライブラリー (pM)
1:10,000	A1	A2	$A = (A1 + A2) / 2$	$W1 = A \times (452/470)$	$C1 = W1 \times 10,000$	$(C1 + C2) / 2$
1:20,000	B1	B2	$B = (B1 + B2) / 2$	$W2 = B \times (452/470)$	$C2 = W2 \times 20,000$	

表8 550 bpライブラリーの濃度の計算

希釈係数	qPCR装置で計算した濃度 (pM) *		希釈したライブラリーの平均濃度 (pM)	希釈したライブラリーのサイズ調整濃度 (pM)	未希釈ライブラリー (pM) *	未希釈ライブラリー (pM)
1:10,000	C1	C2	$C = (C1 + C2) / 2$	$W3 = C \times (452/670)$	$C3 = W3 \times 10,000$	$(C3 + C4) / 2$
1:20,000	D1	D2	$D = (D1 + D2) / 2$	$W4 = D \times (452/670)$	$C4 = W4 \times 20,000$	

*重複データポイント

- ▶ 正しくアノテーションされたKAPA DNA標準液1~6の濃度に関しては、qPCRにより測定された、ライブラリーの1:10,000および1:20,000希釈液の計算濃度を得ます。反復データポイントの平均を用い、ライブラリーの希釈濃度を決定します。
- ▶ ライブラリーの平均断片長とKAPA DNA標準液 (452 bp) との間のサイズの差を考慮し、サイズ調整計算を行います。



注記

Bioanalyzerの測定結果に基づくライブラリーインサートサイズの平均断片長は使いません。Bioanalyzerで測定されたPCRフリーライブラリー断片サイズは、予測されるサイズまたはシーケンスデータに由来するサイズよりもかなり大きくなります。

- ▶ 適切な希釈比 (1:10,000 および 1:20,000 など) を考慮することにより、希釈していないライブラリーの濃度を計算します。各ライブラリーDNA希釈液に対応する反復データポイントの平均を用い、希釈していないライブラリーの濃度を計算します。
- ▶ 反復データの1つが外れ値であると考えられる場合、計算から除くことができます。反復データの2つ以上が外れ値であると考えられる場合、アッセイを繰り返します。

クオリティ制御

断片サイズを確認するために、ライブラリーサイズの分布をチェックします。Agilent Technologies 2100 Bioanalyzerのサンプルの実行は定性目的にのみ使用してください。

- 1 水を使用して1:5のDNAライブラリー希釈物を作成します。
- 2 希釈したDNAライブラリー1μlをHigh Sensitivity DNAチップで実行します。

Bioanalyzerで測定されたライブラリー断片サイズは、予測されるサイズまたはシーケンスデータに由来するサイズを大幅に上回ります。これは、特定の構造上の特徴に起因したチップ上での断片の異常な移動によるものであり、この後のPCR濃縮手順を実施すれば通常除かれます。図2-図3、適切なリファレンスシーケンスに対し、Bioanalyzer由来のライブラリー断片サイズと、ペアエンドリードのアライメント由来の対応するインサートサイズとの比較して示しています。

図2 350 bpインサートライブラリー分布の例

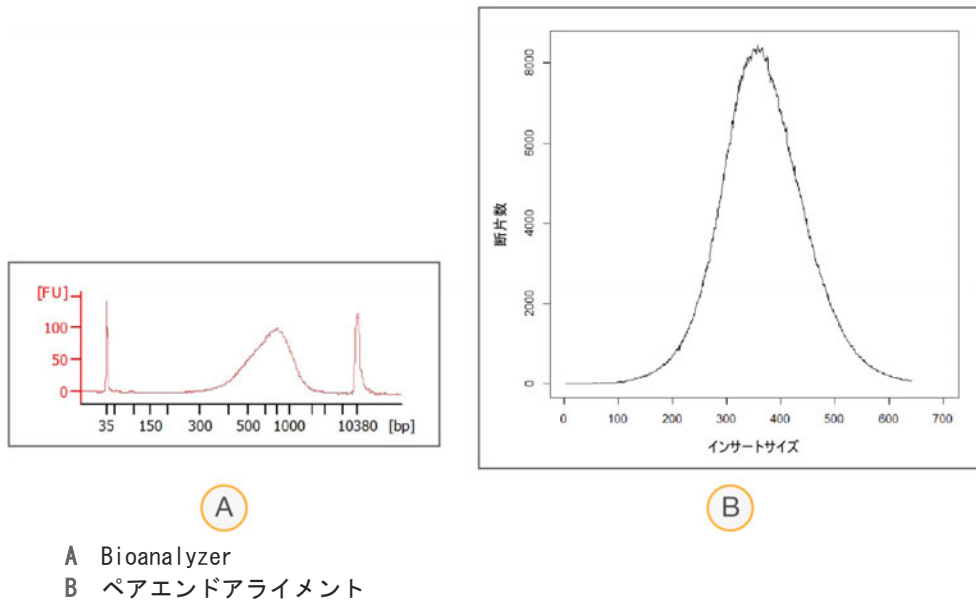
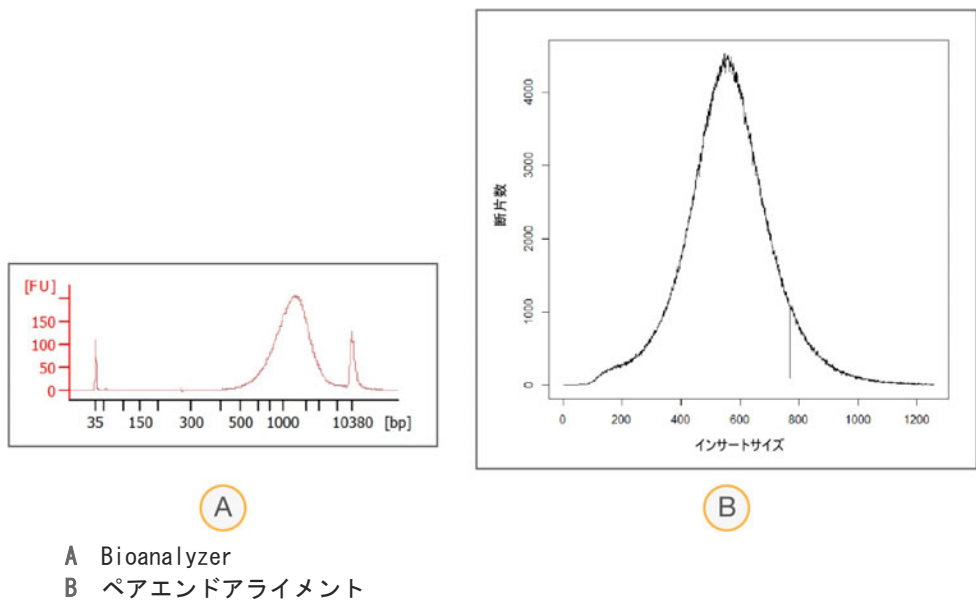


図3 550 bpインサートライブラリー分布の例



ライブラリーの基準化およびプール

本プロセスでは、クラスター形成のためにDNAテンプレートを調製する方法について説明します。インデックスされたDNAライブラリーは、DCTプレートで2 nMに基準化された後、PDPプレートにおいて等量がプーリングされます。インデックスされていないDNAライブラリーは、DCTプレートで2 nMに基準化されます。

消耗品

- ▶ 以下の容器から選択してください：
 - ・ [HS]
 - 96ウェルmidiプレート (1) (40を超えるサンプルをプーリングする場合)
 - 96ウェルハードシェル0.3 mlPCRプレート (2) (40以下のサンプルをプーリングする場合、プーリング専用のセカンドプレート)
 - ・ [LS]
 - 96ウェルmidiプレート (1) (40を超えるサンプルをプーリングする場合)
 - 96ウェル0.3 mlPCRプレート、セミスカート付きまたはスカートレス (2) (40以下のサンプルをプーリングする場合、プーリング専用のセカンドプレート)
- ▶ Microseal 「B」 粘着シール
- ▶ Tris-HCl 10 mM (pH8.5 0.1% Tween 20添加)
- ▶ バーコードラベル
 - ・ DCT (Diluted Cluster Template)
 - ・ PDP (Pooled DCTプレート) (プーリング専用)

調製

- 1 以下のとおりバーコードラベルをプレートに貼ります。
 - ・ DCT (PCRまたはハードシェルPCR プレート)
 - ・ [プーリング専用] PDP (midi (40サンプルを超えてプーリングする場合)、PCR (40サンプル以下をプーリングする場合)、またはハードシェルPCRプレート)

手順

DCTの作製

- 1 ライブラリー5 μ lをDCTプレートの対応するウェルに移します。
- 2 Tris-HCl 10 mM (pH8.5 0.1% Tween20添加) を用いて、ライブラリーの濃度を2nMに基準化し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - ・ [HS] 1000 rpmで2分間攪拌します。
 - ・ [LS] 上下にピペッティングします。



注記

各ライブラリーの収率定量化データにより、各ウェルの最終量は5~100 μ lの範囲で変わります。

- 3 [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 4 以下を実行します。
 - ・ ライブラリーをプールする場合、ワークフローの次の手順に進んでください。
 - ・ ライブラリーをプールしない場合、クラスター形成に進んでください。詳細は、イリミナプラットフォームのシステムガイドを参照してください。

PDPの作製

- 1 2~24サンプルをプーリングする場合、基準化された各ライブラリー5 μ lをPDPプレートのウェルの1つに移します。
- 2 25~96サンプルをプーリングする場合、以下を実行してください。
 - a 基準化されたライブラリーの各カラムから5 μ lをPDPプレートのカラム1に移し、その後以下のとおりしっかり混ぜ合わせます。
 - [HS] 1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
 - b [HS] 280 x gで1分間遠心します。
 - c カラム1の各ウェルの溶液をウェルA2に移します。
- 3 以下のとおり、しっかり混ぜ合わせます。
 - [HS] プレートを1800 rpmで2分間攪拌します。
 - [LS] 上下にピペッティングします。
- 4 [HS] 280 x gで1分間遠心します。
- 5 クラスタ形成に進みます。詳細は、イルミナシーケンスプラットフォームのシステムガイドを参照してください。

安全なストップポイント

停止する場合、プレートを密封し、 -25°C ~ -15°C で保管してください。

補足情報

このガイドに記載されたプロトコールでは、ユーザーがこの章の内容を十分に理解し、必要な装置と消耗品を揃えていることを前提としています。

頭文字

頭文字	定義
ALP	Adapter Ligation Plate
ATL	A-Tailing Mix
CAP	クリーンアップALPプレート
CEP	クリーンアップ末端修復プレート
CFP	Covaris断片化プレート
CSP	クリーンアップ剪断DNAプレート
CTA	A-Tailing Control
CTE	End Repair Control
CTL	Ligation Control
DAP	DNAアダプタープレート
DCT	Diluted Cluster Template Plate
DNA	顧客サンプルDNAプレート
ERP	End Repair Mix
HS	ハイサンプル
HT	高スルーット
IEM	Illumina Experiment Manager
IMP	Insert Modification Plate
LIG	Ligation Mix
LS	ローサンプル
LT	低スルーット
PDP	プーリングされた希釈プレート
RSB	Resuspension Buffer

頭文字	定義
SPB	サンプル精製ビーズ
STL	Stop Ligation Buffer
TSP1	標的サンプルプレート1

キット内容

プロトコールを始める前に、本セクションで指定された試薬がすべて揃っていることを確認します。

TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitは、セットAおよびセットBとして利用できます。各TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitには、最高24サンプル調製するのに十分な量の試薬が含まれています。セットAおよびBをともに使用した場合、各キットの異なる12インデックスを用いて最高24サンプルをプールすることができます。

表9 TruSeq DNA PCR PCR-Free Library Prepキット

キット名	カタログ番号	サポートサンプル数	インデックス番号
TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit-セットA	FC - 121 - 3001	24	12
TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit-セットB	FC - 121 - 3002	24	12
TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit	FC - 121 - 3003	96	96

TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitには、セットAまたはセットBのボックス、SPビーズボックスの2ボックスがあります。

24サンプル-セットAまたはセットBボックス、-25° C~-15° Cで保存
注文したセットに応じて、キットが入ったボックスAまたはBのいずれかを受け取ります。
これらのボックスには、プレートバーコードラベルも入っています。



注記

キットには、ERP2またはERP3、およびATLまたはATL2が入っています。

セットA

数量	試薬	内容
1	RSB	Resuspension Buffer
1	ERP2またはERP3	End Repair Mix
1	ATLまたはATL2	A-Tailing Mix
1	LIG2	Ligation Mix 2
1	CTE	End Repair Control
1	CTA	A-Tailing Control
1	CTL	Ligation Control
1	STL	Stop Ligation Buffer
1	AD002	DNAアダプターインデックス2
1	AD004	DNAアダプターインデックス4
1	AD005	DNAアダプターインデックス5
1	AD006	DNAアダプターインデックス6
1	AD007	DNAアダプターインデックス7
1	AD012	DNAアダプターインデックス12
1	AD013	DNAアダプターインデックス13
1	AD014	DNAアダプターインデックス14
1	AD015	DNAアダプターインデックス15
1	AD016	DNAアダプターインデックス16
1	AD018	DNAアダプターインデックス18
1	AD019	DNAアダプターインデックス19

セットB

数量	試薬	内容
1	RSB	Resuspension Buffer
1	ERP2またはERP3	End Repair Mix
1	ATLまたはATL2	A-Tailing Mix
1	LIG2	Ligation Mix 2
1	CTE	End Repair Control
1	CTA	A-Tailing Control
1	CTL	Ligation Control
1	STL	Stop Ligation Buffer
1	AD001	DNAアダプターインデックス1
1	AD003	DNAアダプターインデックス3
1	AD008	DNAアダプターインデックス8
1	AD009	DNAアダプターインデックス9
1	AD010	DNAアダプターインデックス10
1	AD011	DNAアダプターインデックス11
1	AD020	DNAアダプターインデックス20
1	AD021	DNAアダプターインデックス21
1	AD022	DNAアダプターインデックス22
1	AD023	DNAアダプターインデックス23
1	AD025	DNAアダプターインデックス25
1	AD027	DNAアダプターインデックス27

24サンプルーSPビーズボックス、2° C~8° Cで保存

数量	試薬	内容
1	SPB	サンプル精製ビーズ

TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kitには、コア試薬ボックス、アダプタープレートボックス、SPビーズボックスの3ボックスがあります。

96サンプルー（ボックス2の1）、-25° C~-15° Cで保存

このボックスには、プレートバーコードラベルも入っています。



注記

キットには、ERP2またはERP3、およびATLまたはATL2が入っています。

表10 TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit96サンプル（ボックス2の1）、パーツ番号15037059

数量	試薬	内容
1	RSB	Resuspension Buffer
2	ERP2またはERP3	End Repair Mix
2	ATLまたはATL2	A-Tailing Mix
2	LIG2	Ligation Mix 2
2	CTE	End Repair Control
2	CTA	A-Tailing Control
2	CTL	Ligation Control
2	STL	Stop Ligation Buffer

96サンプルアダプタープレートボックス、 -25°C ～ -15°C で保存

数量	試薬	内容
1	DAP	DNAアダプタープレート、96プレックス

96サンプルSPビーズボックス、 2°C ～ 8°C で保存

数量	試薬	内容
5	SPB	サンプル精製ビーズ

消耗品および装置

プロトコルを始める前に、ユーザが用意する必要な消耗品および備品のすべてが揃っていることを確認します。いくつかの物品の要件は、実施するワークフロー（HSまたはLS）によって決まります。これらの物品は別表に記載しています。

プロトコルは、リストした物品を用いて最適化され、検証されました。消耗品や装置を非純正品で代用した場合、同等の性能は保証されません。

表11 ユーザーが用意する消耗品

消耗品	サプライヤー
1.7 mL微小遠心分離チューブ	一般研究室のサプライヤー
15 ml コニカルチューブ	一般研究室のサプライヤー
10 μl バリアピペットチップ	一般研究室のサプライヤー
10 μl マルチチャネルピペット	一般研究室のサプライヤー
10 μl シングルチャネルピペット	一般研究室のサプライヤー

消耗品	サプライヤー
20 µlバリアピペットチップ	一般研究室のサプライヤー
20 µlマルチチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
20 µlシングルチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
200 µlバリアピペットチップ	一般研究室のサプライヤー
200 µlマルチチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
200 µlシングルチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
1000 µlバリアピペットチップ	一般研究室のサプライヤー
1000 µlマルチチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
1000 µlシングルチャンネルピペット	一般研究室のサプライヤー
96ウェル保存用プレート、ラウンドウェル、0.8 ml (midiプレート)	Fisher Scientific、 パーツ番号：AB-0859
エタノール200プルーフ (アブソルート) 分子生物学用 (500 mL)	Sigma-Aldrich、パーツ番号：E7023
高感度DNAキット	Agilent Technologies、パーツ番号：5067-4626
アイスバケット	一般研究室のサプライヤー
KAPAライブラリー定量キットー Illumina/Universal	KAPA Biosystems、パーツ番号：KK4824
Microseal 「B」 粘着シール	Bio-Rad、パーツ番号：MSB-1001
micro TUBE AFA Fiber 6x16mm ・ クライムキャップ、または ・ プレスリットスナップキャップ (Covaris M220用) 付き	Covaris、パーツ番号： ・ 520052、または ・ 520045
PCRグレード水	一般研究室のサプライヤー
Qubitアッセイチューブまたは Axygen PCR-05-Cチューブ	Life Technologies、 カタログ番号：Q32856または VWR、パーツ番号：10011-830
Qubit dsDNA BRアッセイキット	Life Technologies、カタログ番号 ・ 100アッセイ、Q32850 ・ 500アッセイ、Q32853
RNaseZap (表面除染用)	一般研究室のサプライヤー

消耗品	サプライヤー
RNase/DNaseフリーの8連チューブストリップおよびキャップ	一般研究室のサプライヤー
RNase/DNaseフリーのマルチチャンネル試薬リザーバー、使い捨て	VWR、パーツ番号：89094-658
Tris-HCl 10 mM、pH 8.5	一般研究室のサプライヤー
Tween 20	Sigma-Aldrich、パーツ番号：P7949
超純水	一般研究室のサプライヤー

表12 ユーザーが用意する消耗品—HSワークフロー用追加物品

消耗品	サプライヤー
96ウェルハードシェル0.3 ml PCRプレート	Bio-Rad、パーツ番号HSP-9601
スカートのない96ウェル0.3ml PCRプレートまたは Twin.tec 96ウェルPCRプレート	E&K Scientific、パーツ番号：480096または Eppendorf、パーツ番号：951020303

表13 ユーザーが用意する装置

装置	サプライヤー
2100 Bioanalyzerデスクトップシステム	Agilent Technologies、パーツ番号：G2940CA
以下のCovarisシステムのいずれか： ・ S2 ・ S220 ・ E210 ・ M220	Covaris M220、パーツ番号：500295 他のすべてのモデルについては、Covaris にお問い合わせください
磁気スタンド96	Life Technologies、カタログ番号AM10027
マイクロプレート遠心機	一般研究室のサプライヤー
Qubit 2.0蛍光測定器	Life Technologies、カタログ番号：Q32866
ボルテックス	一般研究室のサプライヤー
qPCRシステム 36ページの qPCRシステムを参照。	一般研究室のサプライヤー

表14 ユーザーが用意する装置—HSワークフロー用の追加物品

装置	サプライヤー
高速マイクロプレートシェーカー	VWR、カタログ番号： ・ 13500-890 (110 V/120 V)、または ・ 14216-214 (230 V)
SciGene TruTemp加熱システム 注意：連続加熱処理をサポートする 2つのシステムを推奨します。	Illumina、カタログ番号： ・ SC-60-503 (110 V)、または ・ SC-60-504 (220 V)
加熱システム用のmidiプレートインサート 注意：連続加熱処理をサポートする 2つのインサートを推奨します。	Illumina、カタログ番号：BD-60-601
ストロボスコープ	一般研究室のサプライヤー

表15 ユーザーが用意する装置—LSワークフロー用の追加物品

装置	サプライヤー
96ウェルサーマルサイクラー (ヒートリッド付き)	一般研究室のサプライヤー

qPCRシステム

下表は、TruSeq DNA PCR-Free Library Prepプロトコル用に検証されたqPCRシステムを示します。

装置	サプライヤー
CFX96 TouchリアルタイムPCR検出システム*	Bio-Rad、パーツ番号：185-5195
Mx3000P qPCRシステム	Agilent、パーツ番号：401511

*CFX Manager softwareバージョン3.0でCq Determinationモード (Single Threshold [単一閾値] モード、ベースラインの設定：ベースライン補正曲線フィットおよびデータ分析用蛍光ドリフト補正適用) を使用してください。この設定により、機器によって蛍光強度の標準曲線に生じた異常を修正することができます。ソフトウェアのインストールについては、Bio-Radにお問い合わせください。

インデックスアダプターシーケンス

本章では、インデックスアダプターシーケンスについて説明します。

インデックスアダプターチューブのシーケンス

TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kitには、以下のインデックスアダプターのシーケンスが含まれています。

- ▶ インデックスの番号付けは連続していません。インデックス17、24、26はありません。
- ▶ シーケンスには7塩基が含まれています。カッコ () 内に示された第7塩基はインデックスリードに含まれません。最初の6塩基のみサンプルシートに記録します。インデックス13以上では、インデックスリードの7番目のサイクルにみられるように、(かっこ内の) 第7塩基がAではない場合があります。
- ▶ インデックスリードのシーケンスに使用するサイクル数に関する詳細については、ご使用のイルミナシーケンスプラットフォームのシステムガイドを参照してください。

表16 TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep KitセットAインデックスアダプターシーケンス

アダプター	シーケンス	アダプター	シーケンス
AD002	CGATGT (A)	AD013	AGTCAA (C)
AD004	TGACCA (A)	AD014	AGTTCC (G)
AD005	ACAGTG (A)	AD015	ATGTCA (G)
AD006	GCCAAT (A)	AD016	CCGTCC (C)
AD007	CAGATC (A)	AD018	GTCCGC (A)
AD012	CTTGTA (A)	AD019	GTGAAA (C)

表17 TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep KitセットBインデックスアダプターシーケンス

アダプター	シーケンス	アダプター	シーケンス
AD001	ATCACG (A)	AD020	GTGGCC (T)
AD003	TTAGGC (A)	AD021	GTTTCG (G)
AD008	ACTTGA (A)	AD022	CGTACG (T)
AD009	GATCAG (A)	AD023	GAGTGG (A)
AD010	TAGCTT (A)	AD025	ACTGAT (A)
AD011	GGCTAC (A)	AD027	ATTCTT (A)

インデックスアダプタープレートのシーケンス

TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep KitのDAPIには以下のインデックスアダプターのシーケンスが含まれています。

サンプルシートに記録されるインデックスアダプターのシーケンスには8塩基が含まれ、インデックスリード中に8塩基すべてがシーケンスされます。

表18 インデックスアダプター1のシーケンス

アダプター	シーケンス	アダプター	シーケンス
D701	ATTACTCG	D707	CTGAAGCT
D702	TCCGGAGA	D708	TAATGCGC
D703	CGCTCATT	D709	CGGCTATG
D704	GAGATTCC	D710	TCCGCGAA
D705	ATTCAGAA	D711	TCTCGCGC
D706	GAATTCGT	D712	AGCGATAG

表19 インデックスアダプター2のシーケンス

アダプター	シーケンス	アダプター	シーケンス
D501	TATAGCCT	D505	AGGCGAAG
D502	ATAGAGGC	D506	TAATCTTA
D503	CCTATCCT	D507	CAGGACGT
D504	GGCTCTGA	D508	GTA CTGAC

図4 DAP デュアルインデックスのレイアウト

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D701-D501	D702-D501	D703-D501	D704-D501	D705-D501	D706-D501	D707-D501	D708-D501	D709-D501	D710-D501	D711-D501	D712-D501
B	D701-D502	D702-D502	D703-D502	D704-D502	D705-D502	D706-D502	D707-D502	D708-D502	D709-D502	D710-D502	D711-D502	D712-D502
C	D701-D503	D702-D503	D703-D503	D704-D503	D705-D503	D706-D503	D707-D503	D708-D503	D709-D503	D710-D503	D711-D503	D712-D503
D	D701-D504	D702-D504	D703-D504	D704-D504	D705-D504	D706-D504	D707-D504	D708-D504	D709-D504	D710-D504	D711-D504	D712-D504
E	D701-D505	D702-D505	D703-D505	D704-D505	D705-D505	D706-D505	D707-D505	D708-D505	D709-D505	D710-D505	D711-D505	D712-D505
F	D701-D506	D702-D506	D703-D506	D704-D506	D705-D506	D706-D506	D707-D506	D708-D506	D709-D506	D710-D506	D711-D506	D712-D506
G	D701-D507	D702-D507	D703-D507	D704-D507	D705-D507	D706-D507	D707-D507	D708-D507	D709-D507	D710-D507	D711-D507	D712-D507
H	D701-D508	D702-D508	D703-D508	D704-D508	D705-D508	D706-D508	D707-D508	D708-D508	D709-D508	D710-D508	D711-D508	D712-D508

テクニカルサポート

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

表20 イルミナー一般問合せ先

ウェブサイト	jp.illumina.com
Eメール	techsupport@illumina.com

表21 イルミナ株式会社カスタマーサポート電話番号

地域	電話番号	地域	電話番号
日本	0800. 111. 5011	スペイン	900. 812168
北米	1. 800. 809. 4566	デンマーク	80882346
アイルランド	1. 800. 812949	ドイツ	0800. 180. 8994
イタリア	800. 874909	ニュージーランド	0800. 451. 650
英国	0800. 917. 0041	ノルウェー	800. 16836
オーストリア	800. 296575	フィンランド	800. 918363
オランダ	800. 0223859	フランス	800. 91185
スイス	800. 563118	ベルギー	800. 81102
スウェーデン	20790181		

製品安全データシート

製品安全データシート (SDS) は、イルミナウェブサイト support.illumina.com/sds.html で入手できます。

製品文書

PDFの製品文書は、イルミナ株式会社ウェブサイトからダウンロードして入手できます。
support.illumina.com にアクセスして「製品」を選択し、**[Documentation & Literature]** を選択します。



パーツ番号 : 15036187 Rev. D JPN



イルミナ株式会社

〒108-0014

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