

アジレント

SureSelect^{XT} RNA ターゲット

エンリッチメントシステム

イルミナマルチプレックス

シーケンス対応

Strand-Specific RNA ライブラリ調製と

ターゲットエンリッチメントプロトコル

和文プロトコル

Protocol Version C.0 対応

[2014年12月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した

SureSelect プラットフォーム

Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.



Agilent Technologies

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、使用プロトコルについて、弊社までお問い合わせいただきますようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の

Protocol

SureSelect RNA^{XT} RNA Target Enrichment

for Illumina Multiplexed Sequencing

Version C.0, December, 2014

G9691-90000

に対応しています。

このプロトコルでは、アジレント SureSelect^{XT} RNA Target Enrichment System のイルミナペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応したキットを用い、Total RNA から polyA RNA を抽出し、そこから調製したライブラリの中でターゲットとする転写産物由来 cDNA をキャプチャするための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ビオチン化 RNA オリゴマーライブラリ (Bait) を使って、ターゲットとする転写物由来 cDNA を濃縮するために開発、最適化されています。キャプチャを行わない、Whole Transcriptome シーケンシングを行う場合は G9691-90010 に対応する和文プロトコルをご覧ください。

本プロトコルに関するご質問やご意見などございましたら、下記のメールアドレスにご連絡ください。

email_japan@agilent.com



Agilent Technologies

1. はじめに

この章では、実験をはじめる前に読む必要がある情報(安全上の注意点、必要な試薬や機器など)について説明しています。必ず実験前にお読みください。

2. サンプル調製

この章では、total RNA からターゲット濃縮のための cDNA シーケンシングライブラリを調製するステップについて説明しています。

3. ハイブリダイゼーション

この章では、前章で調製した cDNA ライブラリをキャプチャライブラリとハイブリダイゼーションさせキャプチャするステップについて説明しています。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

この章では、濃縮されたライブラリのインデックス付加、精製と品質評価ステップについて説明しています。サンプルはシーケンシング前に等量ずつプールします。

5. リファレンス

この章では、本実験に用いる試薬キットの構成成分やインデックス配列、消耗品の付加的な注意点について説明しています。

目次

1. はじめに 6

- 操作に関する注意 8
- 安全に関する注意 8
- 実験に必要な試薬 9
- 実験に必要な装置、消耗品類 11

2. サンプルの調製 13

- STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製 15
- STEP2. Poly(A) RNA の断片化 18
- STEP3. 第一鎖 cDNA の合成 19
- STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製 21
- STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復 22
- STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製 23
- STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化 24
- STEP8. アダプタライゲーション 25
- STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製 26
- STEP10. アダプタ付き cDNA ライブラリの増幅 27
- STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製 29
- STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルのサイズ確認と定量 30

3. ハイブリダイゼーション 32

- STEP1. ライブラリのハイブリダイゼーション 33
- STEP2. 磁気ビーズの調製 38
- STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた cDNA の回収 39
- STEP4. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 41

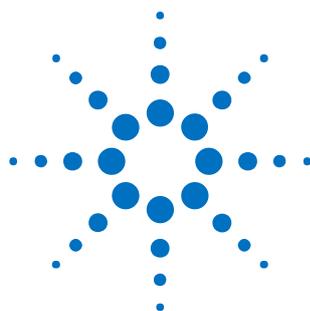
4. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加 42

- STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加 43
- STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 45
- STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認 46
- STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール 48
- STEP5. シーケンスサンプルの準備 50

5. リファレンス 52

- 試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット 53
- 新 8 bp インデックスのマッピング 55
- 新 8 bp インデックスの塩基配列 56
- 試薬一覧 旧来の 8 bp のインデックスが入った試薬キット 57
- 旧来の 8 bp インデックスのマッピング 59
- 旧来の 8 bp インデックスの塩基配列 60

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて 66



1. はじめに

これまでのバージョンでの変更点 7

操作に関する注意 8

安全に関する注意 8

実験に必要な試薬 9

実験に必要な装置、消耗品類 11

最新のプロトコルを参照ください。[Agilentgenomics.jp](https://www.agilentgenomics.jp) の[サポート（実験に必要な情報等）]にジャンプし、[\[お客様専用サポートサイト\]](#)にログインして和文資料をご覧ください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

Target Enrichment Kitを本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となります点、ご了承ください。



これまでのバージョンでの変更点

Version C.0 での変更点

- インデックスプライマーの並び順を変更した新しいキットのリリース(2014年12月)に伴い、新しい構成のキット、旧来の構成のキットの2種類に対応したプロトコルになりました。

インデックスプライマーが白色キャップのチューブ(16反応キット 5500-0134)、もしくは青色プレート(96反応キット 5500-0135)に入っている場合(2014年12月以降に納品された該当の部品番号を含む)キットには、A01からH02(16反応キット)またはA01からH12(96反応キット)の8 bp indexが含まれています。サンプルにIndexをアサインする際は、巻末リファレンス記載の**新8 bp**インデックスプライマー配置および配列情報を参照してください。

インデックスプライマーが透明なキャップのチューブ(16反応キット 5500-0116)、もしくは透明なプレート(96反応キット 5500-0117)に入っている場合(2014年12月以前に納品された該当の部品番号を含む)キットには、1から16(16反応キット)または1から96(96反応キット)の8 bp indexが含まれています。サンプルにIndexをアサインする際は、巻末リファレンス記載の**旧来の8 bp**インデックスプライマー配置および配列情報を参照してください。

Version B.0 での変更点

- 2014年10月にSureSelect Strand Specific RNA Library Prep BOX1(−20°C)のコンポーネントが改訂されました。

2014年10月以前に出荷したBOX1の

- RNA Seq Second Strand + End Repair Master Mix チューブ
- RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix
- RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix

プロトコルバージョン B.0 は新しいBOX1に対応しております。(Step5, p22)

- Step4の溶出量に変更になりました。(STEP4, p21)
- Low TEバッファのサプライヤ情報を更新しました。(表1, p9)
- Sequence Analysis Guidelineを追加しました。(p51)



操作に関する注意

- SureSelect Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。もし長時間空気にさらしてしまった場合は、使用前に pH 試験紙で pH が 12.5～13.5 の間であることを確認してください。pH が 12 以下になると、収量が下がるおそれがあるので、絶対に使用せず、弊社サポート担当にご連絡ください（連絡先はプロトコル末尾に記載）。
- ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用してください。
- 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- RNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けるようにしてください。
- 凍結しているストック溶液を使用する際には次のステップで行います。
 1. 室温以上の温度で加熱しないように、かつできるだけ速く分注された溶液を融かします。
 2. Vortex Mixer で軽く短時間混ぜ、遠心機で5～10秒遠心して、チューブの壁やふたについた液を落とします。
 3. 使用時までオンアイスまたは冷却ブロックの中で保存します。
- Biosafety Level 1(BL1)のルールに基づき、実験を行います。

安全に関する注意

CAUTION

実験室で実験を行う際は、各実験室において決められた規則に従い、保護用の用具（白衣、安全眼鏡など）を着用してください。

実験に必要な試薬

・下記の表は以下の WEB-site から pdf ファイルをダウンロードいただくことができます。

<http://agilentgenomics.jp>

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

・この必要なもののリストは、Total RNA から poly(A)RNA を精製しアダプタを付けてから、SureSelect 試薬を用いて、ターゲット配列をキャプチャ、濃縮するまでの過程に必要な試薬と器具類をまとめたものです。シーケンシングに必要な物は、イルミナ社にお問い合わせください。

表 1 実験に必要な SureSelect RNA ライブラリ調製試薬とキャプチャライブラリ

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量/1反応あたり	内容量	備考
SureSelect 試薬キット						
SureSelectXT RNA Reagents, イルミナ対応, 16反応	Agilent	G9692A	指定	1	16反応分	G9691Aおよびアダプタ、インデックスプライマ、ハイブリに必要な試薬を含む
SureSelectXT RNA Reagents, イルミナ対応, 96反応	Agilent	G9692B	指定	1	96反応分	G9691Bおよびアダプタ、インデックスプライマ、ハイブリに必要な試薬を含む
SureSelect キャプチャライブラリ(ペイト)キット						
SureSelect RNA Kinome, 16 reactions	Agilent	5190-4801	—	1	16反応分	16反応分
SureSelect RNA Kinome, 96 reactions	Agilent	5190-4802	—	1	96反応分	96反応分
SureSelect RNA Capture 1 kb から 499 kb, 16 reactions	Agilent	5190-4934	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4939
SureSelect RNA Capture 1 kb から 499 kb, 96 reactions	Agilent	5190-4935	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4940
SureSelect RNA Capture 0.5 Mb から 2.9 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4944	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4949
SureSelect RNA Capture 0.5 Mb から 2.9 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4945	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4950
SureSelect RNA Capture 3 Mb から 5.9 Mb, 16 reactions	Agilent	5190-4954	—	1	16反応分	再発注の場合、5190-4959
SureSelect RNA Capture 3 Mb から 5.9 Mb, 96 reactions	Agilent	5190-4955	—	1	96反応分	再発注の場合、5190-4960

表 2 実験に必要な試薬

その他の試薬						
Actinomycin D	Sigma	A1410	相当	12ug	2mg	SureSelect Strand Specific RNAライブラリ調製試薬にはアクチノマイシンDが含まれませんので、別途ご用意下さい。固体の製品を購入し、DMSOで4ug/uLに溶解して使用します。調製後1ヶ月以内に使用して下さい。1サンプルあたり60ng使用します。
DMSO (Dimethyl sulfoxide) Molecular Biology Grade	Sigma	D8418	相当	3 uL	50 mL	Actinomycin Dを溶解してストック溶液を調製するために使用します。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	526 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60 mL, A63882 450 mL)もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当		100 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約400 uL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当	1680 uL	500 mL	98%以上、分子生物学用グレード、(ほかの有機溶剤のコンタミネーションが低いこと)

表 3 オプション品となります。必要に応じてご利用ください。

※お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用もしくはバイオアナライザ用、いずれかの消耗品をご用意下さい。

Agilent 2200 TapeStation消耗品						
D1000 ScreenTape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent	5067-5584	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	1ラン		
RNA ScreenTape	Agilent	5067-5576	推奨	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5577	推奨	1ラン		スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。
High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579	推奨	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
High Sensitivity RNA サンプルバッファ	Agilent	5067-5580	推奨	1ラン		スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	1ラン	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	1ラン	10ラン分	1ランで最大14サンプルまで流すことができます。エキスポートソフトウェアVer B02.07 以降が必要です。
Agilent RNA6000ナノキット	Agilent	5067-1511	推奨	1ラン	25ラン分	1ランで最大12サンプルまで流すことができます。スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。
Agilent RNA6000ピコキット	Agilent	5067-1513	推奨	1ラン	25ラン分	1ランで最大11サンプルまで流すことができます。スタート時のRNAの分解度評価にご使用できます。

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

アジレント製品の保証期間は、箱やチューブの入った小袋あるいはボトルに記載の Expiration date(Exp. date)までです。保証期間を過ぎた製品については欠品等があった場合も交換ができない場合がありますので、製品が納品されたらすぐに内容物を確認して下さい。

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するよう計画して下さい。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。

※SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(Bait)はそれぞれの反応数分入っています。

※SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(Bait)のカスタムデザインを eArray で行った場合は、デザイン ID(ELID)が、eArray でデザインし、オーダーしたものと同一であることを確認してください。オリゴキャプチャライブラリのデザイン ID は、チューブラベルおよびチューブの入った箱のラベルに記載されています。

実験に必要な装置、消耗品類

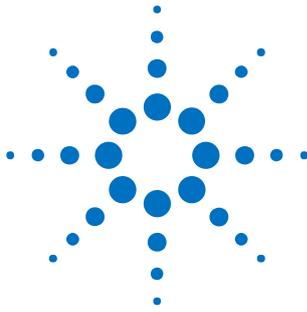
表 4 実験に必要な装置、消耗品類

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量		備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。						
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定			DNA、RNAの定性または定量に使用できません。Expert Software B.02.07以降が必要。
Agilent 2200 TapeStation	Agilent	G2964AA/G2965AA	指定			DNA、RNAの定性または定量に使用できません。
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当			65°C 24hのハイブリド、27µLの液が24µL以下まで蒸発しないこと(HotTop使用)。
96 well plate module for SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent	G8810A	推奨			
96 Well Polypropylene Plate	Agilent	410088	推奨	最大12枚	25 plates	最大280µLの容量が入ること
Mx3000P/Mx3005P optical strip caps (flat type)	Agilent	401425	推奨	26本	strip caps 120本	サーマルサイクラーでの酵素反応・ホルテックス・スピンドアウンなどハイブリダイゼーション時以外に使用
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	推奨	1本	strip caps 120本	410187 コンプレッションマットと組み合わせてハイブリダイゼーションに使うキャップ。溶液の蒸発を防止します。
コンプレッション・マット	Agilent	410187	推奨	1枚	10枚	410096 domed capと組み合わせてハイブリダイゼーションに使うコンプレッション・マット。溶液の蒸発を防止します。
Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート用) または日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	Life Technologies (ベリタス) または日本ジェネティクス	120-27(96ウェルプレート用)、 FG-SSMAG2 (8連チューブ用)	相当			96 well plate用の磁石スタンド。Phenix Research Products (RX-IMAG-96P)など相当品でも可能
巡回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV-03	相当			磁気ビーズ溶液がチューブを上下してよく混ざるように、巡回運動をするタイプのもの。別売りの専用チューブラック(WEB-03-12)と組み合わせると便利
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当			
遠心分離機ローター	Eppendorf	022636006	相当			
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当			45°C以下の低温で、10µLのDNA溶液(elution/リッファ溶液)が1~2時間程度で濃縮できること。 専用ローター、冷却ラップTU-500と油回転真空ポンプGLD-051が必要。

次ページに続く

品名	製造メーカー	品番	指定/ 推奨/ 相当品	必要量	備考
Dynal DynaMag-2	Life Technologies(ベリタス)	123-21D	相当		1.5 - 2mL 遠心チューブ 16本立ての磁気ビーズ用磁石スタンド Dynabeadsを複数サンプル分まとめて調製するのに便利です
Tube-strip capping tool			相当		PCRチューブのキャップを確実に密閉するために便利なツールです。
Nuclease Free 1.5 mL microfuge tubes	Life Technologies	AM12400	相当	500本	核酸の吸着が少なく、且つNuclease Freeであるもの
Nuclease Free 0.2 mL PCRチューブ (thin-walled)	Eppendorf	95262-0030 124.332	相当	1000本	
ピペット	Gilson	P10,P20,P200, P1000	相当		
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当		多検体同時に処理する際に便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアゾルブロックフィルター付き					
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当		
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly Clark	220, 330, 440 (S, M, L サイズ)	相当		
アイスバケツ					
タイマー					
ボルテックスミキサー					
96穴プレート用遠心機	KUBOTA	PlateSpin II	相当		1500 x gで96ウェルプレートのスピンドウンが可能なもの
卓上遠心器	日本ミリボア	チビタンII	相当		
ヒートブロック(37°C)、1.5mLのチューブが入るタイプ					mRNAの精製、AMPure XP ビーズによる精製ステップで使用します。
ウォータバス (Wash Buffer #2のPreWarm, 65°C)			相当		

※65°C、24時間のハイブリダイゼーションに用いるPCR装置、チューブまたは96well-plateとキャップは、必ず事前に27ulの液が24ul以下に蒸発しないことを確認してから使用ください。



2. サンプルの調製

- STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製 15
- STEP2. Poly(A) RNA の断片化 18
- STEP3. 第一鎖 cDNA の合成 19
- STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製 21
- STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復 22
- STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製 23
- STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化 24
- STEP8. アダプタライゲーション 25
- STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製 26
- STEP10. アダプタ付き cDNA ライブラリの増幅 27
- STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製 29
- STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルのサイズ確認と定量 30

SureSelect RNA シーケンシングターゲットエンリッチメントのワークフロー概略を図 1 に示します。

この章では、イルミナプラットフォームに対応した Strand-Specific RNA シーケンシングのための cDNA ライブラリ調製法を説明します。

ライブラリ調製を始める前に、固体のアクチノマイシン D を DMSO で 4 ug/uL のストック溶液に調製します。このアクチノマイシン D DMSO ストック溶液は、-20°C、遮光保存で、1 ヶ月間までであれば溶解して次の実験に使用できます。ライブラリ調製の過程でこの DMSO ストック溶液を水で希釈して使用します (用時調製)。使用時のアクチノマイシン D の終濃度は 120 ng/uL になります。(p19 参照)



2. サンプルの調製

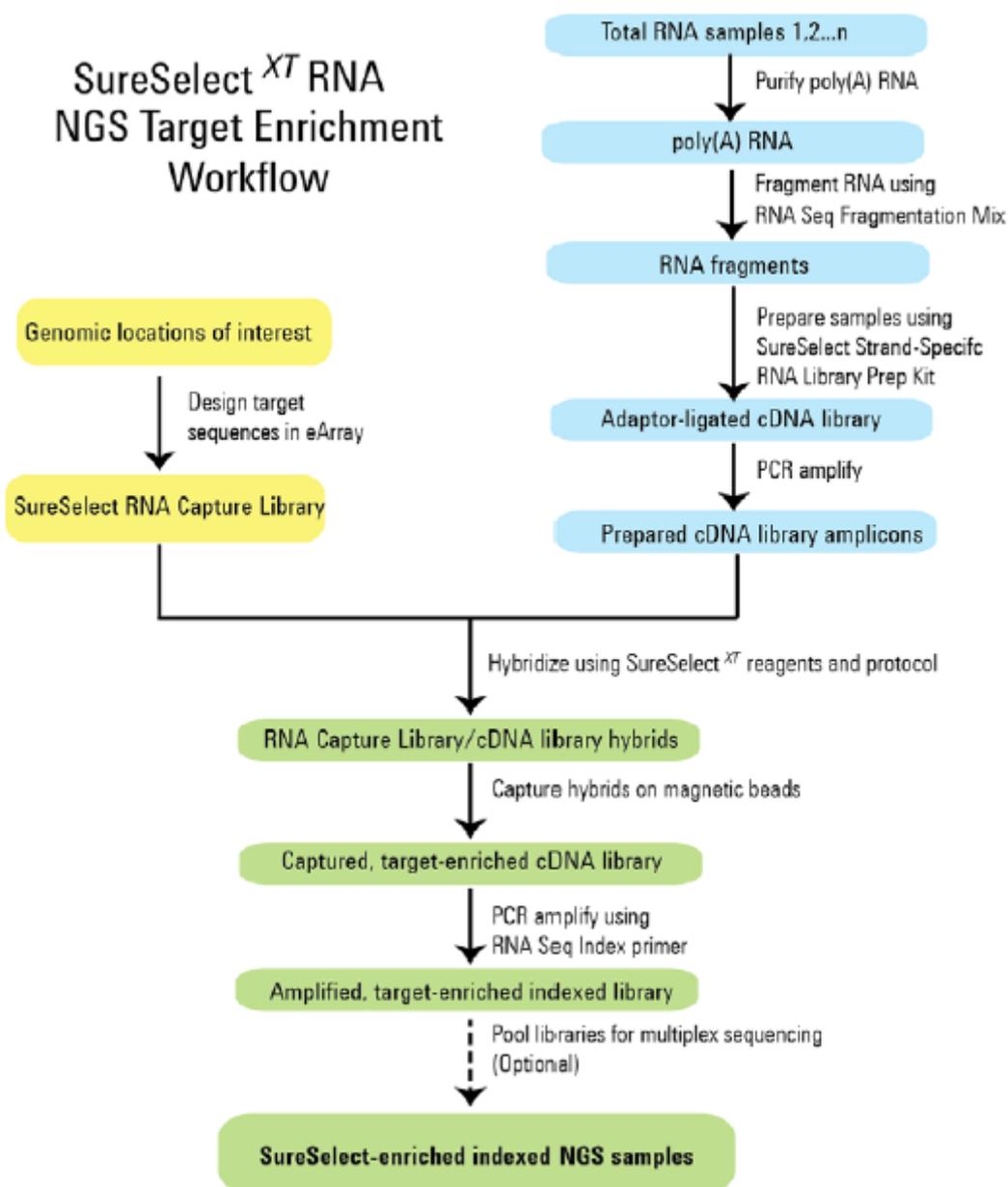


図 1. RNA シーケンシングのサンプル調製ワークフロー概要

STEP1. Total RNA からの Poly(A)RNA 精製

このステップでは、total RNA をオリゴ(dT)磁性ビーズに連続 2 ラウンドにわたって結合させることにより、Poly(A)RNA を精製します。

以下のステップを開始する前に、total RNA を準備して下さい。ターゲットエンリッチメント前のライブラリ調製に必要な total RNA 量は 200 ng から 4 ug です。

NOTE

本プロトコルは RNA Integrity Number (RIN) 8 以上の TotalRNA サンプルを用いてバリデーションされています。RIN が低いサンプルを用いると、オリゴ(dT)磁性ビーズで抽出される PolyA の量に影響を与えます。

表 5 Poly(A) RNA の精製と RNA の断片化に使用する試薬

試薬	保管場所	プロトコルで使用される箇所
Oligo(dT) Microparticles	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 15
RNA Seq Bead Washing Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 16
RNA Seq Bead Elution Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 16
RNA Seq Bead Binding Buffer	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box2 (4°C保存)	P. 17
RNA Seq Fragmentation Mix	SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1 (-20°C保存)	P. 18

1. Total RNA サンプルを nuclease-free 水で 25 uL の容量に調整し、96 ウェルプレートのそれぞれのウェルに入れます。
2. Oligo(T) Microparticles を、色が均一になるまでボルテックスで混合します。ボルテックスしてもビーズが集積していたら、ピペッティングで均一になるまで懸濁します。
3. 25uL の均一な Oligo(T) Microparticle 懸濁液を、96 ウェルプレートの各ウェルに入った total RNA サンプルに加えます。
4. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

2. サンプルの調製

5. サーマルサイクラにプレートを設定し、以下表のプログラムを実行することで Total RNA を変性させます。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。

表 6 RNA 変性のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	65°C	5 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

6. サーマルサイクラが 4°C のホールドステップになったら、プレートを取り出して室温で 5 分インキュベーションします。この間に poly(A) RNA がオリゴ(dT)ビーズに結合します。
7. 室温のままプレートを磁石スタンドに移し、溶液が透明になるまで待ちます(約 2-5 分かかります)。
8. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
9. 磁石スタンドからプレートを取り出し、200 uL の RNA Seq Bead Washing Buffer をそれぞれのウェルに静かに加えます。
10. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。

CAUTION

RNA Seq Bead Washing Buffer は界面活性剤を含みます。ビーズと Wash buffer を混合する際、気泡を作らないように注意して下さい。Wash の過程で気泡が出来た場合、遠心器でスピンドウンしてから先に進んでください。

11. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
12. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
13. 磁石スタンドからプレートを取り出し、25 uL の RNA Seq Bead Elution Buffer をそれぞれのウェルに加えます。
14. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
15. サーマルサイクラにプレートを設定し、以下表のプログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。

表 7 RNA 溶出のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	80°C	2 minutes
Step 2	4°C	1 minute
Step 3	4°C	Hold

16. サーマルサイクラが 4°C のホールドステップに達したらプレートをサーマルサイクラから取り出し、25 uL の [RNA Seq Bead Binding Buffer](#) をそれぞれのサンプルウェルに入れます。
17. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
18. プレートを室温で 5 分間インキュベーションし、poly(A) RNA を再度ビーズに結合させます。
19. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
20. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
21. 磁石スタンドからプレートを取り出し、200 uL の [RNA Seq Bead Washing Buffer](#) をそれぞれのウェルに静かに加えます。
22. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
23. 室温で磁石スタンドにプレートを置き、溶液が透明になるまで待ちます。(2 分以上)
24. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
25. すぐに STEP2. Poly(A) RNA の断片化 に進みます。ここで実験を止めることは出来ません。

2. サンプルの調製

STEP2. Poly(A) RNA の断片化

このステップでは、精製された Poly(A) RNA を RNA シーケンスライブラリ調製に適したサイズにするために、化学的に断片化します。

1. Poly(A) RNA が結合したビーズが入ったプレートをも、磁石スタンドから取り出します。19 uL の **RNA Seq Fragmentation Mix** をそれぞれのサンプルウェルに加えます。
2. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。
3. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は使用します。

表 8 RNA 断片化のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	94°C	8 minutes
Step 2	4°C	Hold

4. 94°C で 8 分間インキュベートしている間に、p. 19 のステップ 1、ステップ 2 を終わらせておきます。

STEP3. 第一鎖 cDNA の合成

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。氷上で [RNA Seq First Strand Master Mix](#) を溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

サンプルと酵素ミックスは、次の準備ステップの作業中は氷上に置いておきます。

CAUTION

ストランド特異性を保つために、次のステップ 1 で 120 ng / μL のアクチノマイシン D 溶液を、使用する直前に調製します。4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のアクチノマイシン D DMSO ストック溶液は、小分けにして -20°C の暗所で保管し、調製後 1 ヶ月以内に使用して下さい。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

1. 以下表に従い、DMSO に溶かした 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ アクチノマイシン D ストック溶液を nuclease-free 水で 120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈します。

表 9 120 ng/ μL アクチノマイシン D 溶液の調製

Reagent	Volume for up to 96-reaction run (includes excess)
Actinomycin D (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in DMSO)	3 μL
Nuclease-free water	97 μL
Total	100 μL

2. 以下表に従い、氷上で [RNA Seq First Strand Master Mix](#) とアクチノマイシン D の希釈液を、サンプル数に応じた量で混合します。

表 10 First Strand Master Mix とアクチノマイシン D の混合液

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Actinomycin D (120 ng/ μL in H_2O)	0.5 μL	8.5 μL
RNA Seq First Strand Master Mix	8.0 μL	136 μL
Total	8.5 μL	144.5 μL

2. サンプルの調製

- 断片化された RNA とビーズの入ったプレートをサーマルサイクラから取り出し、磁石スタンドに置きます。磁石スタンド上に置いたまま、室温で 5 分以上静置します。
- RNA サンプルプレートを室温で磁石スタンドに置いたまま、上澄み液 17 μ L を別の新しいウェルに移します。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。RNA サンプルを含む上澄み液を回収したプレートは、氷上かコールドブロック上で保管します。
- RNA サンプルを回収した氷上のウェルに、上のステップ 2 で準備した **RNA Seq First Strand Master Mix/アクチノマイシン D 混合液** を 8.5 μ L ずつ加えます。
- 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで穏やかに混合します。
- プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
- サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。サーマルサイクラの Hot Top は使用しません。

表 11 第一鎖 cDNA 合成のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	25°C	10 minutes
Step 2	37°C	40 minutes
Step 3	4°C	Hold

- このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。70%エタノールを必要量調製します。

NOTE

同じ日に行う AMPure XP ビーズ精製ステップで使用する 70%エタノールを、この時点でまとめて調製することが出来ます。SureSelect RNA ライブラリ調製プロトコルの“サンプルの調製”の過程を最初から最後まで一日で実行する場合、1 サンプルあたり 1.6 mL の用時調製された 70%エタノールが必要となります。ピペットロスや調製時の誤差を考慮し、余剰分を含めて調製して下さい。

“ハイブリダイゼーション”と“ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスタグの付加”を実行する場合はさらに 0.8 mL の用時調製された 70%エタノールが必要となりますが、保管が出来ないため、ここでは調製しないで下さい。

STEP4. AMPure XP ビーズによる第一鎖 cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 46 uL を、PCR プレート中のサンプル 25.5 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 2 回目の Wash の 70%エタノール 200 uL を取り除いた後、プレートをスピンドウンし、磁石スタンドにプレートを戻します。残存しているエタノールの液滴があればピペットで取り除きます。
12. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 1 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
13. 21 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
14. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
15. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
16. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
17. 上澄み液 約 20 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。
18. すぐに次ページの STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復に進みます。

2. サンプルの調製

STEP5. 第二鎖 cDNA の合成と末端修復

このステップでは、SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1 に含まれている試薬を使用します。氷上で RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix と RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix を溶解し、使用するまで氷上で保管します。使用前に 5 秒間ボルテックスしてください。

サンプルと試薬は、次の準備ステップの作業中は氷上に置いておきます。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットの試薬は粘性が高いため、使用前に溶解した後、チューブをボルテックスでよく攪拌し、他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。**試薬を加える順番を変更しないでください。**

1. 25 uL の RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix を、20 uL の精製された第一鎖 cDNA サンプルに加えます。
2. 5 uL の RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix を上記の各ウェルに加えます。各ウェルの全量は 50uL になります。
3. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
4. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
5. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないで下さい。**

表 12 第二鎖 cDNA 合成と末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	16°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

6. このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。

STEP6. AMPure XP ビーズによる cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、PCR プレート中のサンプル 50uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70% エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70% エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 21 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 20 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20°C で 1 ヶ月まで保管することができます。

2. サンプルの調製

STEP7. cDNA の 3'末端のアデニル化

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。氷上で [RNA Seq dA Tailing Master Mix](#) を溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

1. 20 uL の [RNA Seq dA Tailing Master Mix](#) を、20 uL の末端修復後精製された cDNA サンプルに加えます。
2. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
3. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
4. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないで下さい。**

表 13 dA Tailing のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

STEP8. アダプタライゲーション

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。氷上で [SureSelect Ligation Master Mix](#) と [SureSelect Oligo Adaptor Mix](#) を溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

1. cDNA サンプルが入ったプレートを氷上に移し、5 uL の [SureSelect Ligation Master Mix](#) を A 付加された cDNA サンプル 40 uL に加えます。ピペティングでよく混合します。
2. 5 uL の [SureSelect Oligo Adaptor Mix](#) を各サンプル 45 uL に加えます。
3. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスで混合します。
4. プレートを 1500 x g で 1 分間スピンドウンします。
5. サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。**サーマルサイクラの Hot Top は使用しないで下さい。**

表 14 アダプタライゲーションのサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

7. このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。

2. サンプルの調製

STEP9. AMPure XP ビーズによるアダプタ付き cDNA の精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60 uL を、PCR プレート中のサンプル 50 uL に加えます。ピペッターで 10 回のピペッティングを行い、ビーズとサンプルをよく混合します。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 23 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 3 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 22 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

STEP10. アダプタ付き cDNA ライブラリの増幅

このステップでは、アダプタ付 cDNA を PCR 増幅します。ライブラリ調製に用いた、最初の Total RNA サンプルの量に応じたサイクル数で増幅する必要があります。

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。表 15 に記載された試薬を氷上で溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

CAUTION

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製キットのマスターミックスは粘性が高いため、使用前に溶解した後、マスターミックス液をボルテックスでよく攪拌し、マスターミックスを他の溶液に加えた後もボルテックスでよく攪拌して下さい。

- 以下表に従って氷上で Pre-Capture PCR 反応ミックスを調製し、ボルテックスでよく混合します。

表 15 Pre-capture PCR 反応ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
RNA Seq PCR Master Mix	25 μ L	425 μ L
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1 μ L	17 μ L
SureSelect Primer (forward primer)	1 μ L	17 μ L
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	1 μ L	17 μ L
Total	28 μL	476 μL

- ステップ 1 で調製した Pre-Capture PCR 反応ミックス 28 μ L を、22 μ L の精製されたアダプタ付き cDNA サンプルに加えます。ピペティングでよく混合します。異なるサンプルのピペティングを行う際はチップを新しいものに交換して下さい。

2. サンプルの調製

3. サーマルサイクラにプレートを設定し、以下表のプログラムを実行します。Hot Top を使用します。

表 16 Pre-Capture PCR のサーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	37°C	15 minutes
2	1	95°C	2 minutes
3	9–13 cycles (see Table 17)	95°C	30 seconds
		65°C	30 seconds
		72°C	1 minute
4	1	72°C	5 minutes
5	1	4°C	Hold

表 17 Pre-Capture PCR のサイクル数の推奨

Amount of total RNA used for library prep	Cycle Number
200 ng–2 µg	11–13
2.1 µg–4 µg	9–11

4. このサーマルサイクラのランを実行する間に、次のステップの AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。

STEP11. AMPure XP ビーズによる増幅されたライブラリの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
3. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 60 uL を、プレート中の PCR 産物 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(5 分間以上)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。過度の乾燥は避けるようにします。
12. 26 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 25 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20°C で保管することができます。

2. サンプルの調製

STEP12. Agilent2100 バイオアナライザによる cDNA サンプルのサイズ確認と定量

NOTE

代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は *Agilent 2200 TapeStation User Manual* を参照してください。

精製、増幅したアダプタ付き cDNA ライブラリのサイズと濃度をバイオアナライザ DNA1000 アッセイを用いて測定します。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 μ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア (version B.02.07 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 180 bp-550 bp の位置にスミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。正確に定量するために、サンプルの濃度が DNA 1000 アッセイの直線範囲内にあることを確認して下さい。

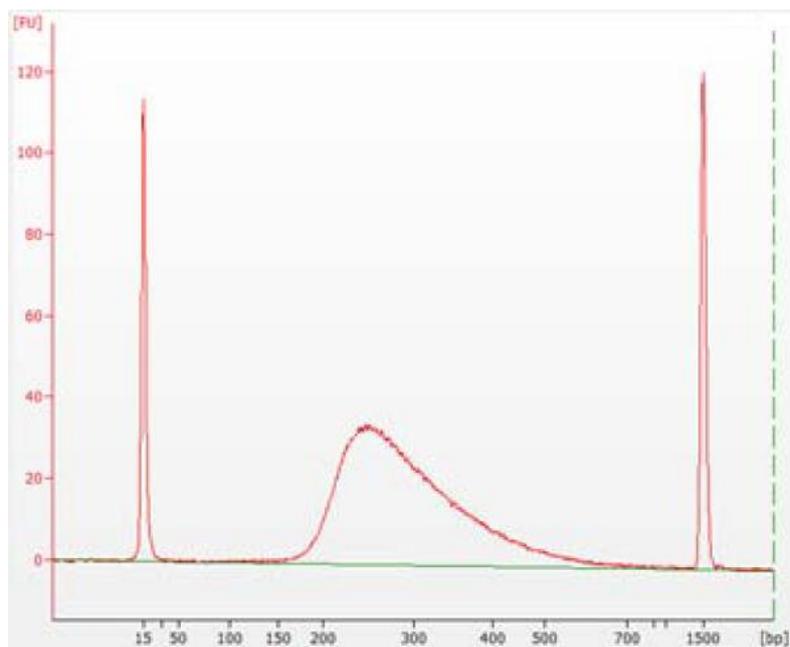


図 2 DNA 1000 キットを用いた増幅後の cDNA ライブラリの泳動図。180 から 550 bp の間にシングルピークが見られることを確認して下さい。

NOTE

SureSelect のハイブリダイゼーションには 100 ng のアダプタ付き cDNA ライブラリが必要です。キャプチャライブラリとアダプタ付き cDNA ライブラリの量のバランスは重要なので、できるだけ 100 ng の量をハイブリダイゼーションに用いるようにしてください。

また濃度は 30 ng/μL 以上である必要があります。濃度は 30 ng/μL より低い値が得られる場合が多いので、その時には濃縮遠心機を用いて、サンプルを濃縮してください。濃縮遠心を行う場合、45°C 以上の高い温度をかけないようにしてください。(トミー精工社の濃縮遠心機を使用する場合は、温度は Low, 40°C で濃縮遠心します。) 実際の操作については、次の章を参考にしてください。



3. ハイブリダイゼーション

STEP1. ライブラリのハイブリダイゼーション 33

STEP2. 磁気ビーズの調製 38

STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 38

STEP4. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 41

この章では、前章で調製したアダプタ付き cDNA ライブラリと、アジレント社の SureSelect オリゴキャプチャライブラリをブロッキング試薬とともにハイブリダイズします。

CAUTION

SureSelect オリゴキャプチャライブラリとアダプタ付き cDNA ライブラリの比は、高い Capture 効率を得るために極めて重要です。プロトコル記載の量に従って、ハイブリダイゼーションを行ってください。

SureSelect Reagent Kit の試薬一覧については、53 ページの SureSelect Reagent Kit 構成試薬一覧を参照してください。

CAUTION

capture のためのハイブリダイゼーションは 24 時間(以上)行いますが、この間に 27-29 μL という少量のハイブリ溶液の蒸発を防ぐ必要があります。実験を行う前に、必ず、実験で使用する予定のサーマルサイクラ装置 (Hot Top 付き)、Strip チューブもしくはプレート、シール方法 (Strip キャップもしくはシーリングテープ) の組み合わせで、オリゴキャプチャライブラリとアダプタ付き cDNA ライブラリを入れない状態で、水 27 μL をハイブリ溶液の代わりに用意し、65°C で 24 時間 (以上)、事前テストを行ってください。必ず使用する予定のウェルポジションに、テストサンプルをセットして試験するようにしてください。(ウェルによっては、端と中央で、蒸発が異なるものがあります。)

キャップもしくはシールによる密閉を確実に行うことが重要です。

蒸発量は 3-4 μL を超えないようにしてください。(ハイブリダイゼーション後に、最低でも 20 μL の液が残ること。)

手持ちの組み合わせでのテストで、3-4 μL 以上の蒸発が見られる場合、巻末の組み合わせリストを参照して、適切な組み合わせを探してください。このプロトコルは、ライブラリ中での PCR による偏りを最小にするように最適化されています。ほとんどのサンプルで、少なくとも一回のハイブリダイゼーションに十分な量の cDNA (100 ng) が得られますが、RNA の品質などが収量に影響する場合があります。



STEP1. ライブラリのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応には、100 ng の cDNA (容量 3.4 μ L) が必要です。前章でバイオアナライザ測定によって得られた定量値を元に、濃度調整を行います。

1. 調製したアダプタ付き cDNA ライブラリの濃度は、30 ng/ μ L 以上である必要があります。得られた濃度が低い場合には、以下の手順で 30 ng/ μ L 以上になるように濃縮遠心機を用いて濃縮してください。
 - a. 前章で調製したライブラリ全量を 1.5 mL のチューブに入れます。チューブのふたには、1つ以上の穴をあけるようにしてください。またはチューブのふたを取り去り、パラフィルムでかわりにふたをして、そのパラフィルムに穴をあけておきます。
 - b. 45 $^{\circ}$ C 以下の低温で濃縮遠心機を用い、溶液を完全に蒸発させます。
 - c. 濃度が 30 ng/ μ L になるように、適切な量の nuclease-free 水に再溶解させます。サンプルが濃縮遠心中に失われることが懸念される場合は、濃度が 30 ng/ μ L より濃くなるように、再溶解させます。ピペッティングによってチューブの内壁に付着したサンプルをよく再溶解させてください。
 - d. ボルテックスミキサを用いて混合し、遠心機で1分間スピンドウンします。
2. (オプション) 100 ng に相当する量のライブラリ溶液を別のチューブに取り分け、3.4 μ L になるまで濃縮をすることも可能です。ライブラリ溶液を完全乾固させた場合は 3.4 μ L に水に再溶解し、ボルテックスミキサを用いて混合して下さい。多検体を一度に処理する場合、100 ng 分の液量は各サンプルで異なりますのでご注意ください。

3. ハイブリダイゼーション

- 以下表に従い、新しい 1.5 mL チューブか 0.2 mL のチューブを用いてハイブリダイゼーションバッファを室温で調製します。調製が終わったハイブリダイゼーションバッファは、ステップ 8 で使用するまで 37°C に置いておきます。

表 18 ハイブリダイゼーションバッファの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Hyb #1 (orange cap or bottle)	25 µL	350 µL
SureSelect Hyb #2 (red cap)	1 µL	14 µL
SureSelect Hyb #3 (yellow cap)	10 µL	140 µL
SureSelect Hyb #4 (black cap or bottle)	13 µL	182 µL
Total	49 (40 µL needed)	686 (40 µL/sample)

※Hyb #3 (黄キャップ) は -20°C 保存品です。使用後の保存にご注意ください。

- 以下表に従い、新しい 1.5 mL チューブか 0.2 mL のチューブを用いて SureSelect Block ミックスを調製します。

表 19 SureSelect Block ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Indexing Block #1 (green cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect Block #2 (blue cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect Indexing Block #3 (brown cap)	0.6 µL	10.2 µL
Total	5.6 µL	95.2 µL

- 以下表に従い、新しい 1.5 mL チューブか 0.2 mL のチューブを用いて必要な量の SureSelect RNase Block 1:4 希釈液を調製します。RNase Block の終濃度は 25% になります。調製後氷上に置いておきます。

表 20 25% RNase Block 溶液の調製

Component	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
RNase Block (purple cap)	0.5 µL	8.5 µL
Nuclease-free water	1.5 µL	25.5 µL
Total	2 µL	34 µL

- 新しい 1.5 mL チューブか 0.2 mL のチューブを用い、ハイブリダイゼーション 1 反応につき 5 µL の SureSelect RNA キャプチャライブラリを取り分け、2 µL の 25% RNase Block 溶液を加えてピペティングでよく混合します。調製後氷上に置いておきます。

表 21 キャプチャライブラリと RNase Block 混合液の調製

Component	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Dilute RNase Block	2 μ L	34 μ L
Capture Library	5 μ L	85 μ L
Total	7 μL	119 μL

7. 新しい PCR プレート (Strip チューブでも可) に、ターゲット濃縮のために調製したアダプタ付き cDNA ライブラリを入れます。このプレートもしくは Strip チューブで 24 時間のハイブリダイゼーションを行うため、ここでは p.32 に記載の蒸発テストを行って問題のなかった組み合わせの PCR プレートもしくは Strip チューブを用いて下さい。
 - a. 3.4 μ L に 100 ng の量 (濃度 30 ng/ μ L) になるように調製したアダプタ付き cDNA ライブラリを、PCR プレートの “B” 列に入れます。複数のサンプルをキャプチャする場合は、それぞれのサンプルを異なるウェルに入れてください。図 3 は 12 キャプチャを行う場合の例を示しています。Strip チューブでハイブリダイゼーションを行う場合は各列を各 Strip に読み替えて下さい。
 - b. ステップ 4 で調製した、5.6 μ L の SureSelect Block ミックスを同じ “B” 列に入れます。
 - c. ピペッティングでよく混合します。
 - d. PCR プレートの “B” 列 (もしくはサンプルと SureSelect Block Mix を入れたウェル) をキャップでしっかりと密閉し、PCR プレートをサーマルサイクラにセットします。ハイブリダイゼーションバッファとキャプチャライブラリはまだ加熱せずに、SureSelect Block ミックスを加えたアダプタ付き cDNA ライブラリのみを加熱します。

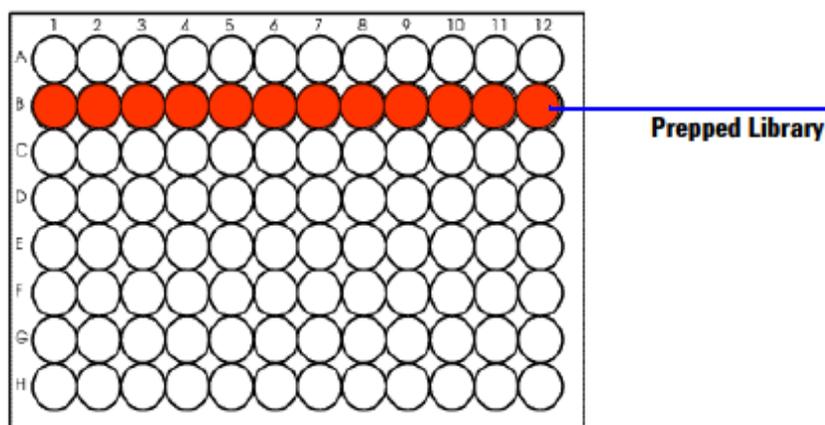


図 3 赤: アダプタ付き cDNA ライブラリと SureSelect Block ミックスの混合液
(96 ウェルプレートを用いて 12 キャプチャを行うためにセットした例)

- e. 以下表のプログラムに従い、サーマルサイクラをランします。サーマルサイクラ中のサンプルを確実に 65°C に保つため、Hot Top を 105°C に設定して使用します。

3. ハイブリダイゼーション

表 22 サーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	95°C	5 minutes
Step 2	65°C	Hold

CAUTION

サーマルサイクラの蓋は熱いため、火傷を起こすことがあります。蓋の近くで作業するときには気をつけてください。

8. プレートを65°Cに保った状態で、ハイブリダイゼーションバッファ(ステップ3で調製して37°Cに置いておいたもの)をキャプチャ反応数の分、PCRプレートの”A”列の各ウェルにそれぞれ40 uLずつ加え、キャップできちりと蓋をします。ハイブリダイゼーションバッファを加えた後このプレートが5分以上加温されている状態になってから、次のステップ9に進んでください。ただし、5分以上時間が経過すると溶液が蒸発していくので、5分経ったら次のステップ9にすみやかに進んでください。

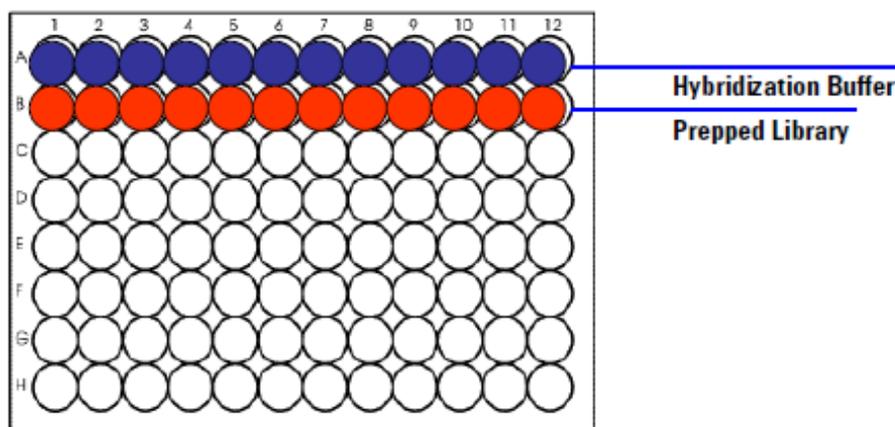


図 4 青:ハイブリダイゼーションバッファ (12キャプチャを行うためにセットした例)

9. ステップ6で調製したキャプチャライブラリミックスを下記手順でPCRプレートに入れます。
 - a. キャプチャライブラリミックス全量(7 uL)を、ハイブリバッファとアダプタ付き cDNA ライブラリを入れた PCR プレートの ”C” 列に入れます。複数のサンプルをキャプチャするために8連チューブで7 uL のキャプチャライブラリを準備した場合は、マルチチャンネルピペットを使って、キャプチャライブラリミックスを ”C” 列に移してください。この作業中 PCR プレートは 65 °C に保つようにしてください。
 - b. ウェルを Strip キャップで密閉します。適切なキャッピングツールなどを用いて、密閉が確実に行われるようにしてください。
 - c. 65 °C で 2 分間インキュベーションします。

10. PCR プレートに 65 °C に保ったままの状態を、"A" 列のハイブリダイゼーションバッファ 13 μ L を "C" 列の各 SureSelect キャプチャライブラリミックスに加えます。必要に応じてマルチピペットを使用してください。

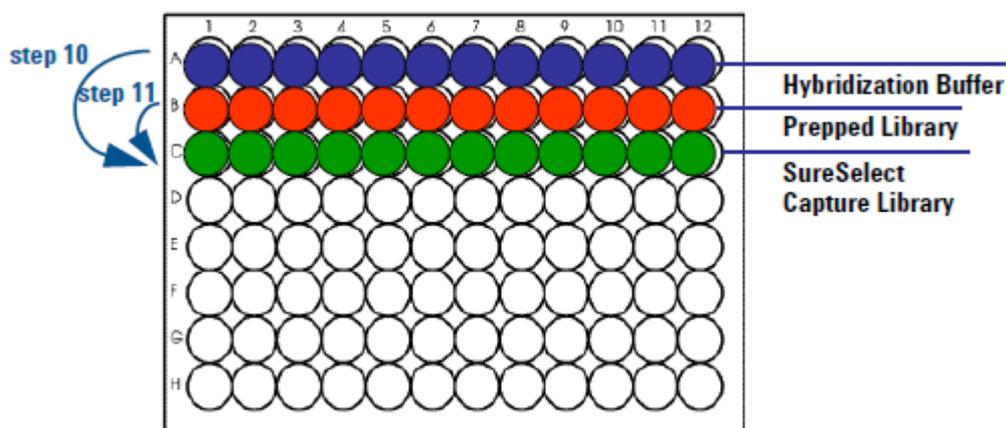


図 5 緑: SureSelect キャプチャライブラリミックス
(96 ウェルプレートを用いて 12 キャプチャを行うためにセットした例)

11. PCR プレートに 65 °C に保ったままの状態を、"B" 列のアダプタ付き cDNA ライブラリミックス 9 μ L (9 μ L より減っている場合、その全量) を "C" 列の各オリゴキャプチャライブラリミックスに加えます。必要に応じてマルチピペットを使用してください。ピペッティングを 8-10 回行って、"C" 列の液を十分に混合してください。ハイブリダイゼーション用の Mixture (アダプタ付き cDNA ライブラリ、ブロッキング試薬と SureSelect キャプチャライブラリのミックス) はこの時点で 27-29 μ L の量となります。量はこれまでの操作中の蒸発により異なります。
12. 事前のテストで蒸発が抑えられることを確認している Strip キャップか密閉用のフィルムを用いて、ウェルを確実に密閉します。

CAUTION

サンプルが入ったすべてのウェルが確実に密閉されていることを確認してください。チューブやプレートとキャップの間にわずかでも隙間があると、液はハイブリ中に蒸発してしまいます。ハイブリダイゼーション中に 3-4 μ L 以上の溶液が蒸発しないように、事前に使用する PCR プレートやチューブ、キャップの組み合わせでテストしてください。(p.32 参照)

13. Hot Top (加熱式の蓋) を 105 °C に加熱した状態で、65 °C で 24 時間ハイブリダイゼーションします。溶液の蒸発を防ぐために、ふたは必ず 105 °C に加熱してください。

2. サンプルの調製

STEP2. 磁気ビーズの調製

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Binding Buffer
- SureSelect Wash 2

1. 事前に SureSelect Wash 2 を水浴中で 65 °C に加温しておきます。1 サンプルあたり 0.6 mL 使用しますので、必要量を 1.5 mL チューブもしくはコニカルチューブに入れて、加温します。次の STEP3 で使用します。続いて STEP4 で使用する AMPure XP ビーズもここで室温に戻しておき、必要量の 70% エタノールも準備しておくとう便利です。
2. ボルテックスミキサーを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気ビーズを十分に再懸濁します。磁気ビーズは必ず指定のものを使用してください。
3. 1 キャプチャ反応あたり 50 μ L の Dynabeads MyOne Streptavidin T1 磁気ビーズを、新しい PCR プレートの各ウェルに取り分けます。
4. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 200 μ L の SureSelect Binding Buffer を加えます。
 - b. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner でスピンドウンします。
 - c. ビーズの入ったプレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。
 - d. ビーズを吸い込まないように注意しながら、上澄み液を取り除いて廃棄します。
 - e. ステップ a から d までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。
5. ビーズを 200 μ L の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。
6. p. 40 のステップ 4 で行う AMPure XP ビーズ精製の準備を行います。使用する AMPure XP ビーズを必要量取り分け、室温に戻しておきます。70% エタノールを必要量調製します。
“SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた cDNA の回収”と“ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスタグの付加”を両方同日に実施する場合は 1 サンプルあたり 0.8 mL の用時調製された 70% エタノールが必要となります。

STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた cDNA の回収

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Wash 1
- SureSelect Wash 2
- SureSelect Elution Buffer
- SureSelect Neutralization Buffer

CAUTION

SureSelect Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。もし SureSelect Elution Buffer を長時間空気にさらしてしまった場合は、使用前に pH 試験紙で pH が 12.5~13.5 の間であることを確認してください。pH が 12 以下になると、収量が下がるおそれがあるので、使用しないでください。

SureSelect Elution Buffer のボトルは、使用しないときには確実にキャップを閉めるようにしてください。

1. 24 時間のハイブリダイゼーション後、チューブに残っているハイブリダイゼーション溶液（アダプタ付き cDNA と SureSelect オリゴキャプチャライブラリの混合液）の量を、マルチチャンネルピペットを使って見積もり、記録します。この計測はできるだけ短時間に行ってください。20 μ L 以下に液が減っている場合、キャプチャ性能に悪影響を与える可能性があります。また蒸発してしまっている場合は、実験をこれ以上進めることができません。再度、蒸発を最小に防ぐための組み合わせを確認ください。一度に計測できる数よりも多数のキャプチャ反応を行っている場合、残りのウェルは蓋をしたままにし、蒸発させないように注意して下さい。
2. PCR プレートに 65°C の PCR 装置に載せたまま、ピペットで吸引して計量したハイブリダイゼーション溶液全量を、そのまま直接 200 μ L のビーズ溶液に加えます。10 回以上ゆっくりとピペッティングを行い、液を上下させてサンプルとビーズを混合します。続けて次のサンプルを処理する場合は、必ずピペットチップを新しいものに交換し、目盛を 29 μ L に戻すようにしてください。
3. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ハイブリダイゼーション溶液とビーズの入ったプレートを巡回運動するミキサーの上にセットし、室温で 30 分間インキュベーションします。5 分ごとに、ビーズがウェル内を動いて攪拌が行われていること、ウェルの底に集積していないことを確認してください。
4. インキュベーション後、プレート遠心器か mini-plate spinner でスピンドウンします。
5. プレートを磁石スタンドにセットし、ビーズとバッファを分けます。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。（ビーズを吸い込むと、収量に影響します。）
6. ビーズの入ったウェルに、200 μ L の SureSelect Wash 1 を加え、ボルテックスミキサで 5 秒間攪

3. ハイブリダイゼーション

拌して、ビーズを再懸濁させます。

7. サンプルを室温で 15 分間インキュベーションします。
8. ビーズの入ったプレートが磁石スタンドにセットして、ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除きます。

CAUTION

ここからの洗浄過程の間、ビーズ懸濁液を 65°C に保つことがキャプチャの特異性を確保するのに重要です。使用前に SureSelect Wash Buffer #2 が 65°C に予め温められていることを確認してください。組織用のインキュベータなどの温度変動が大きい装置は使用しないでください。

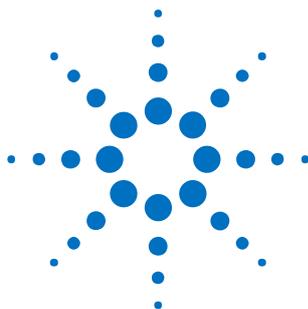
9. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 事前に 65 °C に加温しておいた **SureSelect Wash 2** を 200 µL 各ウェルに加え、8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をしてボルテックスミキサで 5 秒間攪拌して、ビーズを再懸濁させます。
 - b. サーマルサイクラを用いて、65 °C で 10 分間インキュベーションします。時々転倒混和し、ウェルの底に集積したビーズを攪拌して下さい。
 - c. インキュベーション後、プレート遠心器か mini-plate spinner でスピンドウンします。
 - d. プレートを磁石スタンドにセットし、ビーズとバッファを分けます。
 - e. 溶液が透明になるまで待ちます。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。
 - f. ステップ a から e までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。

3 回の洗浄の後、**SureSelect Wash 2** が完全に除去されたことを確認します。
10. ビーズの入った各ウェルに、50 µL の **SureSelect Elution Buffer** を加えます。アルカリ性なので、取り扱いには特に注意してください。Elution Buffer は使用直前にキャップを開け、使用後はすぐにキャップを閉めるようにしてください。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をしてボルテックスミキサで 5 秒間攪拌して、ビーズを再懸濁させます。
11. 室温で 10 分間インキュベーションします。
12. ビーズの入ったプレートが磁石スタンドにセットして、ビーズと Elution Buffer を分離します。
13. ピペットを用いて、上澄み液を新しいプレートのウェルに移します。この時点で **SureSelect のオリゴ** にキャプチャされた cDNA ライブラリは上澄み液の方に移っていますので、上澄み液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。
14. 50 µL の **SureSelect Neutralization Buffer** を加えます。

STEP4. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、PCR プレート中の cDNA サンプル 100 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(3 から 5 分間程度)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。ペレットにひびが入っているように見える状態までは乾かさないうで下さい。過度に乾燥させると溶出効率に悪影響を与える可能性があります。
12. 40 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 40 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20°C で 1 ヶ月まで保管することができます。



4. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

- STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加 43
- STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 45
- STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認 46
- STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール 48
- STEP5. シーケンスサンプルの準備 50

この章では、前章で調製したキャプチャ後のライブラリを、増幅する過程で同時にインデックスバーコードタグを付けた後、精製し、定量およびクラスタ増幅用に適切に希釈した後、バーコード付加したサンプルをマルチプレックスシーケンシングのためにプールするステップを説明します。



STEP1. キャプチャライブラリの増幅とインデックスバーコードタグの付加

このステップでは、SureSelect によって濃縮した cDNA ライブラリを PCR 増幅し、インデックスタグを付加します。このプロトコルでは増幅に、キャプチャしたライブラリの半量を使用します。残りは-20°Cで保管し、必要であれば次回の実験に用いることができます。

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

このステップでは、[SureSelect Strand Specific RNA Library Prep Kit, Box1](#) に含まれている試薬を使用します。

表 23 に記載された試薬を氷上で溶解して混合し、使用するまで氷上で保管します。

1 つの cDNA ライブラリについて 1 つのインデックスタグ付加 PCR 反応を準備します。

1. 各サンプルにどのインデックスを付加するかを決定します。

CAUTION

本プロトコルは、新 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットと、旧来の 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットの両方に対応しています。インデックス付加に進む前に、どちらのキットを使用しているかを確認し、巻末のリファレンスを参照し、適切した情報を参照してください。

新 8 bp のインデックスプライマー (A01-H12)

16 反応では、5500-0134 のキットの中の白色キャップのチューブ中に入っています。

96 反応では、5500-0135 のキットの中の青色ウェルプレートの中に入っています。

旧来の 8 bp のインデックスプライマー (1-96)

16 反応では、5500-0116 のキットの中の透明キャップのチューブ中に入っています。

96 反応では、5500-0117 のキットの中の透明ウェルプレートの中に入っています。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

- 以下表に従い、新しい 1.5 mL のチューブか 0.2 mL のチューブに PCR 反応ミックスを調製して下さい。ボルテックスで混合し、スピンドウンした後氷上に保管して下さい。

表 23 Post-Capture PCR 反応ミックスの調製

Reagent	Volume for 1 Reaction	Volume for 16 Reactions (includes excess)
RNA Seq PCR Master Mix	25 μ L	425 μ L
RNA Seq ILM Post-Capture PCR Primer	1 μ L	17 μ L
Total Volume	26 μL	442 μL

- PCR プレートの新しいウェルに、前ステップで調製した Post-Capture PCR 反応ミックスを 1 反応あたり 26 μ L 分注します。
- 5 μ L の適切なインデックスプライマー (RNA Seq Index A01-H12 または 1 番から 96 番, 8bp) をそれぞれの PCR 反応ミックスのウェルに加えます。プールして同じレーンでシーケンスする予定のサンプルには、異なるインデックスプライマーを使用して下さい。このステップで cDNA ライブラリを増幅するために使用する新、旧それぞれのインデックスプライマーのインデックス部分の配列については、使用しているインデックスの種類をよく確認のうえ、巻末のリファレンスを参照して下さい。
- 各 Post-Capture PCR 反応ミックスに、19 μ L の精製された cDNA ライブラリを加えます。ピペティングで完全に混合します。
- サーマルサイクラにプレートをセットし、以下表のプログラムを実行します。Hot Top を 105°C に設定して使用します。

表 24 インデックス付加 Post-Capture PCR のサーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	2 minutes
2	12	95°C	30 seconds
		57°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	5 minutes
4	1	4°C	Hold

この時点で PCR 終了後の精製に用いる AMPure XP ビーズを、必要量室温に戻しておくとう便利です。

STEP2. AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ(4 °C 保存)を室温に戻しておくようにします。決して凍らせないようにしてください。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 400 uL+余剰分の 70%エタノールを調製します。ステップ 8 で使用するまで室温で置いておきます。
3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、よく混合します。
4. 均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、PCR プレート中の PCR 産物 50 uL に加えます。8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、プレートを 5 秒間ボルテックスでよく混合し、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
5. サンプルを 5 分間、室温でインキュベーションします。
6. プレートを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(3 から 5 分間程度)
7. プレートを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除きます。この際、ピペットの先でビーズに触れないように注意します。
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各ウェルに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
9. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除き、廃棄します。
10. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返し、計 2 回 Wash を行います。
11. 37°C にセットしたサーマルサイクラ上で、サンプルを 3 分間乾燥させます。サーマルサイクラのふたは開けたままにしておきます。ペレットにひびが入っているように見える状態までは乾かさないうで下さい。過度に乾燥させると溶出効率に悪影響を与える可能性があります。
12. 30 uL の Nuclease-free 水を各ウェルに加えます。
13. 8 連キャップか Adhesive seal でプレートに蓋をして、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、プレート遠心器か mini-plate spinner で軽くスピンドウンします。ビーズを底に集積させずに飛び散った液体だけをウェルの底に集めるようにします。
14. その後室温で 2 分間インキュベーションします。
15. プレートを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2 分間程度静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 30 uL を新しいウェルに移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20°C で保管することができます。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

NOTE

代わりに [High Sensitivity D1000 ScreenTape \(Agilent p/n 5067-5582\)](#) と [High Sensitivity D1000 Reagents \(Agilent p/n 5067-5583\)](#) を使用する方法を選択することができます。詳細は *Agilent 2200 TapeStation User Manual* を参照してください。

精製したキャプチャライブラリの収量とサイズ分布をバイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを用いて測定します。High Sensitivity DNA チップで分析する各サンプルの量は、NGS 用ライブラリのような広いサイズ分布をもつスミアサンプルの場合、正確に定量するために 100 pg/uL から 10 ng/uL の範囲にしてください。バイオアナライザの和文ガイドブックは下記 Web サイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 μ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア (**version B.02.07** もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダを調製します。

CAUTION

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースライン不安定を引き起こすことがあります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1 μ L に 1x TE 1 μ L を加えて 2 倍に希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1 μ L とって測定することをお勧めします。

4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。図 6 の泳動図のように、約 200 – 700 bp の間にシングルピークが分布していることを確認します。また PCR の非特異的増幅産物がないかどうか確認します。このシングルピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

High Sensitivity Kit でスミアサンプルを正確に定量できる濃度は、100 pg/uL から 10 ng/uL です。測定の結果定量範囲を超えた場合、TE で希釈してから再測定してください。収量が低すぎる、または泳動図で非特異的ピークが見られた場合、サイクル数を調節してからもう一度 PCR を行ってください。PCR のサイクル数を少なくしながらも、シーケンシングに必要な量を得るようにします。この後 NGS 用定量 PCR キットを用いることで、1 レーンに等量のサンプルを混合するために、さらに正確な濃度の決定を行うことができます。

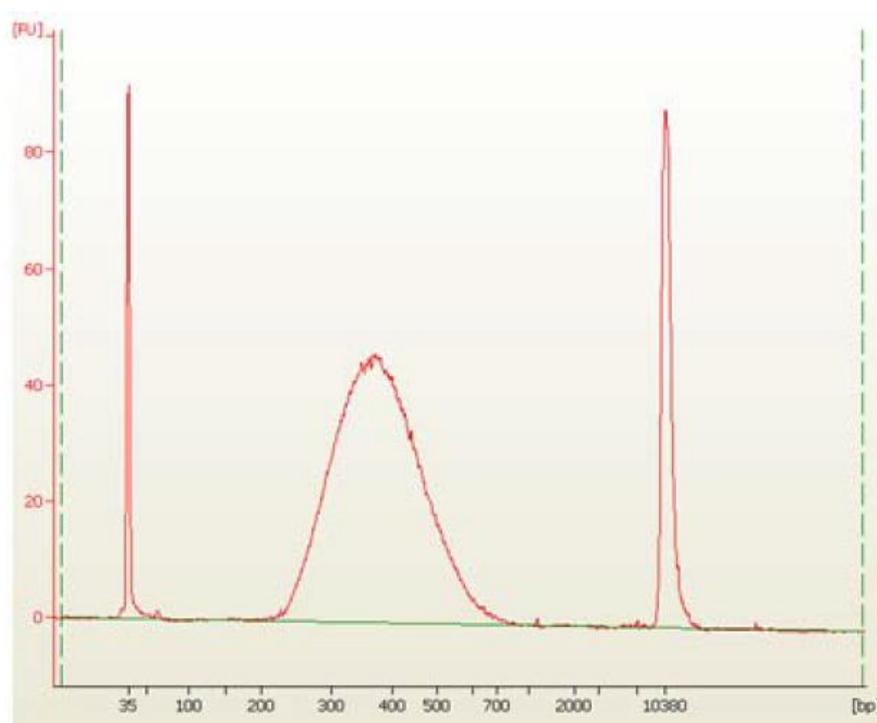


図 6 増幅後のキャプチャ DNA の泳動図。200 から 700 bp の間にシングルピークが見られることを確認して下さい。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

STEP4. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

シーケンシングレーン 1 つでマルチプレックスが可能なインデックス付きライブラリの総数は、使用するプラットフォームの出力性能と、ご自身の研究デザインにおいてキャプチャライブラリの解析に必要なシーケンシングデータの量によって決まります。RNA シーケンシングの目的によって必要なカバレッジは変わるため、必要なカバレッジと、使用するプラットフォームのキャパシティにしたがって、1 レーンに混合可能なインデックス数を検討してください。

1. プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、インデックス付加サンプルをプールするための量を計算します。

$$\text{Volume of Index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

V(f) : プール後の最終的な必要量

C(f) : プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例: イルミナ標準プロトコルでは 10 nM

: プールするインデックスバーコードタグの数

C(i) : 各インデックス付加サンプルの初期濃度

表 25 に 4 つのインデックス付加サンプル(それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。最終的な量 20 μ L (10 nM の濃度)にするには 1x Low TE Buffer を用います。

表 25 トータル量 20 μ L にするためのインデックスタグ付きサンプルの混合例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use (μ L)
Sample 1	20 μ L	20 nM	10 nM	4	2.5
Sample 2	20 μ L	10 nM	10 nM	4	5
Sample 3	20 μ L	17 nM	10 nM	4	2.9
Sample 4	20 μ L	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

- 最終的に必要な濃度になるように、最終的な液量の調整を行います。
 - プールしたインデックス付加サンプル量の総量が必要な量より少ない場合、1x Low TE Buffer を用いて総量を調整します。
 - プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が必要な量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して必要な量に調整します。
- 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween20 を 0.1 %(v/v)の濃度になるように加えて-20 $^{\circ}$ Cで短期間保存できます。
- template の変性とフローセルの調製に進みます。イルミナ社のプロトコルを参照ください。

ライブラリのプールのための希釈とプール方法は、フローセルのキャパシティと分析のパイプラインによって異なります。必ずイルミナ社の適切なプロトコルを参照ください。このプロトコルは 100 base の Paired-end 用のものです。Read 長は実験の目的に合わせて適切な長さを選択してください。

4. ハイブリダイゼーション後の増幅 STEP5. シーケンスサンプルの準備

STEP5. シーケンスサンプルの準備

イルミナ社の Paired-End Cluster Generation Kit を用いてクラスタ形成に進んでください。

アジレント社 R&D でのテストランにおいて、SureSelect Strand-Specific RNA ターゲットエンリッチメントシステムで調製したライブラリで適切なクラスタ密度を得るには、Exome のキャプチャライブラリと同程度の濃度でクラスタ形成を行うとよいという結果が得られています。例えば、Exome のライブラリを 8-10pM の濃度で Seeding し、800-900K/mm² のクラスタ密度を得ている場合、SureSelect Strand-Specific RNA ターゲットエンリッチメントシステムで調製したライブラリも 8-10 pM 程度の濃度を用いています。本データを参照いただき、適切な濃度でクラスタ形成を行うようにしてください。

本プロトコルは 2 x 100 bp シーケンシングランでバリデーショナルされていますが、リード長は目的によって変更することができます。

8-bp インデックスタグ付加 RNA Seq のためのシーケンシングランセットアップガイドライン

シーケンシングランを以下表に示す Cycles 設定を使用して 8-nt インデックスリードを行うよう設定してください。サイクル数設定は、装置コントロールソフトウェアインターフェイスのインデックスタイプ選択ボタンから Custom を選択した後、Run Configuration スクリーンで指定できます。

表 26 HiSeq プラットフォーム Run Configuration スクリーン Cycle Number 設定*

Run Segment	Cycle Number
Read 1	100
Index 1 (i7)	9
Index 2 (i5)	0
Read 2	100

* 設定は v3.0 SBS ケミストリーの場合

Sequencing Analysis Guideline

1. Demultiplex について

8 bp のインデックス配列を用いて、Demultiplex を行う際には、インデックス配列の 1 bp のミスマッチを許容する設定にしてください。

2. Strand 情報について

SureSelect Strand-Specific RNA ライブラリ調製システムを用いた方法では、下記のように strand 情報が保存されます。

第一鎖 cDNA は、poly(A)RNA 転写産物の相補鎖です。第二鎖 cDNA は、PCR 前に除去されます。

そのため、シーケンス結果における Read1,2 それぞれの strand は下記の対応となります。

- Read1 (P5 側) は第一鎖 cDNA と一致
- Read2 (P7 側) は第二鎖 cDNA、poly(A)RNA strand と一致

データ解析で strand の方向性を決める際に、上記の情報を考慮ください。

例えば、Picard tools(<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を使って RNA シーケンスのメトリクスを計算する場合、正しく strand 特異性を計算するために下記のパラメーターを含めてください。

```
STRAND_SPECIFICITY=  
SECOND_READ_TRANSCRIPTION_STRAND
```



5. リファレンス

試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット 53

新 8 bp インデックスのマップ 55

新 8 bp インデックスの塩基配列 56

試薬一覧 旧来の 8 bp のインデックスが入った試薬キット 56

旧来の 8 bp インデックスのマップ 58

旧来の 8 bp インデックスの塩基配列 59

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて 65

この章では、リファレンス情報について説明します。



CAUTION

以下のリファレンスは、新 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。旧来の 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、P56.から記載されている情報を参照してください。

新 8 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0134 のボックス中の白色キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0135 のボックス中の青色 96 ウェルプレートに入っています。

試薬一覧 新 8 bp のインデックスが入った試薬キット

(白色キャップチューブもしくは青色ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect XT RNA 試薬キットは、室温保存品、4°C保存品、-20°C保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。また、キャプチャライブラリは-80°C 保存です。必ず指定温度で保管してください。また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うようご注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 27 SureSelect RNA-Seq キット(新 8 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Component Kits	Storage Condition	16 Samples	96 Samples
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1	-20°C	5500-0134	5500-0135
SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2	4°C	5190-6410	5190-6411
SureSelect Target Enrichment Box 1	Room Temperature	5190-4393	5190-4394
SureSelect Target Enrichment Box 2	-20°C	5190-6261	5190-6262

5. リファレンス

SureSelect Reagent Kit の試薬一覧

表 28 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1 (新 8 bp インデックス対応) (-20°C保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions (p/n 5500-0134)	96 Reactions (p/n 5500-0135)
RNA Seq Fragmentation Mix	tube with red cap	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Enzyme Mix	tube with blue cap	bottle
RNA Seq Second-Strand + End-Repair Oligo Mix	tube with yellow cap	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	tube with green cap	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	tube with red cap	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-capture PCR Primer	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect ^{XT} Indexes, 8 bp*	SureSelect 8 bp Indexes A01 through H02, provided in 16 tubes with white caps	SureSelect 8 bp Indexes A01 through H12, provided in blue 96-well plate [†]

* 56 ページのインデックス配列をご覧ください。

†55 ページのプレートマップをご覧ください。

表 29 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2(4°C保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
Oligo(dT) Microparticles	tube with brown cap	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	tube with purple cap	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	tube with green cap	bottle
Nuclease Free Water	bottle	bottle

表 30 SureSelect Target Enrichment Box #1(室温保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect Hyb 1	tube with orange cap	tube with orange cap
SureSelect Hyb 2	tube with red cap	tube with red cap
SureSelect Hyb 4	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle
SureSelect Elution Buffer	tube with blue cap	bottle
SureSelect Neutralization Buffer	tube with clear cap	bottle

表 31 SureSelect Target Enrichment Box #2(-20°C保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect Hyb 3	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Indexing Block 1	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Block 2	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect ILM Indexing Block 3	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap

新 8 bp インデックスのマップ

表 32 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #1 5500-0135 に含まれている 青色 96 ウェルプレートの新 8 bp インデックス A01-H12 までのマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

5. リファレンス

SureSelect Reagent Kit の試薬一覧

新 8 bp インデックスの塩基配列

表 33 新 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は白色キャップのチューブ A01-H02、
96 反応は青色プレート A01-H12)

Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence
A01	ATGCCTAA	A04	AACTCACC	A07	ACGTATCA	A10	AATGTTGC
B01	GAATCTGA	B04	GCTAACGA	B07	GTCTGTCA	B10	TGAAGAGA
C01	AACGTGAT	C04	CAGATCTG	C07	CTAAGGTC	C10	AGATCGCA
D01	CACTTCGA	D04	ATCCTGTA	D07	CGACACAC	D10	AAGAGATC
E01	GCCAAGAC	E04	CTGTAGCC	E07	CCGTGAGA	E10	CAACCACA
F01	GACTAGTA	F04	GCTCGGTA	F07	GTGTTCTA	F10	TGGAACAA
G01	ATTGGCTC	G04	ACACGACC	G07	CAATGGAA	G10	CCTCTATC
H01	GATGAATC	H04	AGTCACTA	H07	AGCACCTC	H10	ACAGATTC
A02	AGCAGGAA	A05	AACGCTTA	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA	E06	ATTGAGGA	E09	AGATGTAC	E12	ACACAGAA
F03	GCGAGTAA	F06	GTCGTAGA	F09	TCTTCACA	F12	GAACAGGC
G03	ACTATGCA	G06	AGAGTCAA	G09	CCGAAGTA	G12	AACCGAGA
H03	CGGATTGC	H06	CCGACAAC	H09	CGCATACA	H12	ACAAGCTA

CAUTION

以下のリファレンスは、旧来の 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。新 8 bp のインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、P52 から記載されている情報を参照してください。

旧来の 8 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0116 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0117 のボックス中の透明 96 ウェルプレートに入っています。

試薬一覧 旧来の 8 bp のインデックスが入った試薬キット (透明キャップチューブもしくは透明ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect XT RNA 試薬キットは、室温保存品、4°C保存品、-20°C保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。また、キャプチャライブラリは-80°C 保存です。必ず指定温度で保管してください。また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うようにご注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 34 SureSelect RNA-Seq キット(旧来の 8 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Component Kits	Storage Condition	16 Samples	96 Samples
SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit, ILM, Box 1	-20°C	5500-0116	5500-0117
SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit, ILM, Box 2	4°C	5190-6410	5190-6411
SureSelect Target Enrichment Box #1	Room Temperature	5190-4393	5190-4394
SureSelect Target Enrichment Box #2	-20°C	5190-6261	5190-6262

次に、各 Box の内容について以下の表に示します。

表 35 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 1(旧来の 8 bp インデックス対応)
(-20℃保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
RNA Seq Fragmentation Mix	tube with red cap	bottle
RNA Seq First Strand Master Mix	tube with orange cap	tube with orange cap
RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix	tube with blue cap	bottle
RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix	tube with yellow cap	tube with yellow cap
RNA Seq dA Tailing Master Mix	tube with green cap	bottle
SureSelect Ligation Master Mix	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect Oligo Adaptor Mix	tube with blue cap	tube with blue cap
RNA Seq PCR Master Mix	tube with red cap	bottle
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Primer	tube with brown cap	tube with brown cap
RNA Seq ILM Reverse PCR Primer	tube with black cap	tube with black cap
RNA Seq ILM Post-Capture PCR Primer	tube with green cap	tube with green cap
RNA Seq Indexes, 8 bp	RNA Seq Indexes 1-16, 8 bp provided in 16 tubes with clear caps	RNA Seq Indexes 1-96, 8 bp provided in 96-well plate*

※ 表 39 のプレートマップをご覧ください。

表 36 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box 2(4℃保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
Oligo(dT) Microparticles	tube with brown cap	bottle
RNA Seq Bead Binding Buffer	tube with purple cap	bottle
RNA Seq Bead Washing Buffer	bottle	bottle
RNA Seq Bead Elution Buffer	tube with green cap	bottle
Nuclease Free Water	bottle	bottle

表 37 SureSelect Target Enrichment Box #1(室温保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect Hyb # 1	tube with orange cap	tube with orange cap
SureSelect Hyb # 2	tube with red cap	tube with red cap
SureSelect Hyb # 4	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle
SureSelect Elution Buffer	tube with blue cap	bottle
SureSelect Neutralization Buffer	tube with clear cap	bottle

表 38 SureSelect Target Enrichment Box #2(-20°C保存)の内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions
SureSelect Hyb # 3	tube with yellow cap	tube with yellow cap
SureSelect Indexing Block #1	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Block #2	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect Indexing Block #3	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap

旧来の 8 bp インデックスのマップ

表 39 SureSelect Strand Specific RNA Library Prep, ILM, Box #1 5500-0117 に含まれている透明 96 ウェルプレートの旧来の 8 bp インデックス 1-96 までのマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Index 1	Index 9	Index 17	Index 25	Index 33	Index 41	Index 49	Index 57	Index 65	Index 73	Index 81	Index 89
B	Index 2	Index 10	Index 18	Index 26	Index 34	Index 42	Index 50	Index 58	Index 66	Index 74	Index 82	Index 90
C	Index 3	Index 11	Index 19	Index 27	Index 35	Index 43	Index 51	Index 59	Index 67	Index 75	Index 83	Index 91
D	Index 4	Index 12	Index 20	Index 28	Index 36	Index 44	Index 52	Index 60	Index 68	Index 76	Index 84	Index 92
E	Index 5	Index 13	Index 21	Index 29	Index 37	Index 45	Index 53	Index 61	Index 69	Index 77	Index 85	Index 93
F	Index 6	Index 14	Index 22	Index 30	Index 38	Index 46	Index 54	Index 62	Index 70	Index 78	Index 86	Index 94
G	Index 7	Index 15	Index 23	Index 31	Index 39	Index 47	Index 55	Index 63	Index 71	Index 79	Index 87	Index 95
H	Index 8	Index 16	Index 24	Index 32	Index 40	Index 48	Index 56	Index 64	Index 72	Index 80	Index 88	Index 96

旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) を次ページ以降に示します。それぞれのインデックスは 8 nt の長さです。8-bp のインデックスを用いたシーケンシングライブラリのシーケンシング設定は、表 26 をご覧下さい。

旧来の 8 bp インデックスの塩基配列

表 40 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 1-16

Index Number	Sequence
1	AACGTGAT
2	AAACATCG
3	ATGCCTAA
4	AGTGGTCA
5	ACCACTGT
6	ACATTGGC
7	CAGATCTG
8	CATCAAGT
9	CGCTGATC
10	ACAAGCTA
11	CTGTAGCC
12	AGTACAAG
13	AACAACCA
14	AACCGAGA
15	AACGCTTA
16	AAGACGGA

表 41 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 17-32

Index Number	Sequence
17	AAGGTACA
18	ACACAGAA
19	ACAGCAGA
20	ACCTCCAA
21	ACGCTCGA
22	ACGTATCA
23	ACTATGCA
24	AGAGTCAA
25	AGATCGCA
26	AGCAGGAA
27	AGTCACTA
28	ATCCTGTA
29	ATTGAGGA
30	CAACCACA
31	CAAGACTA
32	CAATGGAA

表 42 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 33-48

Index Number	Sequence
33	CACTTCGA
34	CAGCGTTA
35	CATACCAA
36	CCAGTTCA
37	CCGAAGTA
38	CCGTGAGA
39	CCTCCTGA
40	CGAACTTA
41	CGACTGGA
42	CGCATACA
43	CTCAATGA
44	CTGAGCCA
45	CTGGCATA
46	GAATCTGA
47	GACTAGTA
48	GAGCTGAA

表 43 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 49-64

Index Number	Sequence
49	GATAGACA
50	GCCACATA
51	GCGAGTAA
52	GCTAACGA
53	GCTCGGTA
54	GGAGAACA
55	GGTGCGAA
56	GTACGCAA
57	GTCGTAGA
58	GTCTGTCA
59	GTGTTCTA
60	TAGGATGA
61	TATCAGCA
62	TCCGTCTA
63	TCTTCACA
64	TGAAGAGA

表 44 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 65-80

Index Number	Sequence
65	TGGAACAA
66	TGGCTTCA
67	TGGTGGTA
68	TTCACGCA
69	AACTCACC
70	AAGAGATC
71	AAGGACAC
72	AATCCGTC
73	AATGTTGC
74	ACACGACC
75	ACAGATTC
76	AGATGTAC
77	AGCACCTC
78	AGCCATGC
79	AGGCTAAC
80	ATAGCGAC

表 45 旧来の 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は透明キャップのチューブ、96 反応は透明プレート) 81-96

Index Number	Sequence
81	ATCATTCC
82	ATTGGCTC
83	CAAGGAGC
84	CACCTTAC
85	CCATCCTC
86	CCGACAAC
87	CCTAATCC
88	CCTCTATC
89	CGACACAC
90	CGGATTGC
91	CTAAGGTC
92	GAACAGGC
93	GACAGTGC
94	GAGTTAGC
95	GATGAATC
96	GCCAAGAC

5. リファレンス

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて

SureSelect のハイブリダイゼーションでは、27-29 μL という少量の溶液を 24 時間(以上)にわたってハイブリダイゼーションするため、蒸発を防ぐことが大切です。必ず、使用を予定している手持ちのサーマルサイクラ、ウェルプレート、チューブ、キャップ、シールで事前にテストを行ってください。(p.30 参照)

下記の表 39 は、これまでにアジレント社で確認している、蒸発を抑えられる組み合わせになります。これらの組み合わせで用いる場合であっても、必ず事前にテストをしてからハイブリダイゼーションに用いください。またキャップの密閉がゆるいと、この組み合わせであっても液が蒸発してしまうので、セットするときには念入りに注意してください。

表 46 蒸発を抑えられることが過去に確認された組み合わせ

サーマルサイクラ	プレート/ストリップ	カバー	備考
Stratagene Mx3005P QPCR	Mx3000P Strip Tubes (401428)	Mx3000P Optical Strip Caps (401425)	Heated Lid
Stratagene Mx3005P QPCR	MicroAmp Optical 96-well reaction plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
ABI GeneAmp 9700	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Caps (8caps/strip) (N801-0535)	Heated Lid
ABI Veriti (4375786)	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf 8-Tube PCR Tubes	Attached lids	Lid heating set to 75°C
BioRad (MJ Research) PTC-200	Stratagene strip tubes 410022 (Mx4000)	Stratagene Optical cap 410024 (Mx4000)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Stratagene strip tubes 410022 (Mx4000)	Stratagene Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Stratagene 96-well Plate 410088 (Mx3000/3005)	Stratagene Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid

Copyright Agilent Technologies 2014

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。

本和文プロトコルの著作権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

本書の内容の一部または全部を無断で複製、転載したり、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複製、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル、CD-ROM 等の媒体は本製品用にだけお使いください。

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。

* 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。



Agilent Technologies