

illumina®

# Illumina DNA Prep

## Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000025416 v10 JPN

2021年8月

**本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。**

本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上を使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づ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説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を及ぼし、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

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

# 目次

<b>概要</b> .....	<b>1</b>
DNAインプットに関する推奨事項 .....	1
DNAインプット量100 ng~500 ng .....	1
DNAインプット量100 ng未満 .....	1
DNA純度の評価.....	2
血液および唾液のインプットに関する推奨事項.....	2
サンプルのインプットに関する推奨事項 .....	3
PCRアンプリコン .....	3
追加リソース.....	4
<b>プロトコール</b> .....	<b>5</b>
ライブラリー調製のワークフロー .....	7
ゲノムDNAのタグメンテーション .....	8
タグメンテーション後の精製.....	9
タグメンテーションしたDNAの増幅 .....	11
ライブラリーの精製.....	13
ライブラリーのプーリング .....	15
ライブラリーのクオリティのチェック（オプション） .....	16
ライブラリーの開始濃度への希釈 .....	18
<b>付録2 追加の手順</b> .....	<b>20</b>
[オプション] 血液の溶解 .....	20
[オプション] 唾液の溶解 .....	22

<b>付録2 サポート情報</b> .....	<b>24</b>
Illumina DNA Prepアッセイの動作 .....	24
キットの内容 .....	26
Illumina DNA Prepの内容 .....	27
インデックスキットの内容 .....	28
Flex Lysis Reagent Kit (オプション) .....	28
記号説明 .....	29
消耗品および機器 .....	30
消耗品 .....	30
機器 .....	31
略語 .....	32
<b>改訂履歴</b> .....	<b>33</b>
<b>テクニカルサポート</b> .....	<b>37</b>

# 概要

このガイドでは、Illumina DNA Prep のワークフローを用いて DNA から最大 384 種類のユニークデュアルインデックスペアエンドライブラリーを調製する方法を説明します。

Illumina DNA Prep のワークフローには次のような特徴があります。

- 酵素反応であるタグメンテーションを用いた、わずか 15 分での DNA の断片化とアダプター配列の付加
- 100 ng 以上のインプット量での革新的なサンプルノーマライゼーション
- サンプルプーリングとシーケンシングの効率化
- マスターミックス試薬による、容器、ピペッティング、ハンズオンタイムの削減
- 必要な最小インプット量はわずか 1 ng
- 抽出プロトコルを用いた場合、全血サンプルまたは唾液サンプルから直接ライブラリーを調製可能
- 抽出したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルに対応。最適な性能を実現するには  $\Delta Cq \leq 5$  を推奨

## DNAインプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep プロトコルは DNA インプット量 1 ng ~ 500 ng 以上に対応します。ヒト DNA サンプルおよびその他の大きく複雑なゲノムでは、推奨される最小 DNA インプット量は 100 ng ~ 500 ng です。微生物などの小さいゲノムでは、DNA インプット量 1 ng にも対応できます。DNA インプット量を減らす場合は、それに応じて PCR サイクル条件を変更してください。

DNA の純度を評価して、最初の DNA サンプルが 1 mM を超える EDTA を含有せず、フェノールやエタノールなどの有機的な夾雑物を含まないことを確認します。これらの物質はタグメンテーション反応を妨げ、アッセイの失敗につながる可能性があります。

### DNAインプット量100 ng~500 ng

DNA インプット量 100 ng ~ 500 ng では、最初の DNA サンプルの定量とノーマライズは必要ありません。

### DNAインプット量100 ng未満

このプロトコルでは、DNA インプット量 100 ng 未満での最終ライブラリー収量をノーマライズしません。したがって、シーケンシングの前にライブラリーの定量とノーマライズが必要です。

使用する DNA インプット量が 100 ng 未満の場合、最初の DNA サンプルを定量して PCR サイクル数を決定することを推奨します。蛍光定量を使用した手法で二本鎖 DNA のインプットを定量してください。NanoDrop やその他の UV 吸収法など、総核酸を測定する方法は避けてください。詳細については、[3 ページの「サンプルのインプットに関する推奨事項」](#)を参照してください。

## DNA 純度の評価

UV 吸収法は DNA サンプルの純度評価に用いる一般的な方法です。波長 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比からサンプル純度の指標を求めます。このプロトコールは、純粋な DNA サンプルであることを示す 260/280 の吸光度比 1.8 ~ 2.0 の DNA に対して最適化されています。

サンプル純度の副次的指標には、波長 260 nm の吸光度と 230 nm の吸光度の比を使用します。260/230 の吸光度比の目標は 2.0 ~ 2.2 です。この範囲外の値は夾雑物の存在を示します。発生源や回避方法、ライブラリー調製への影響を含めたコンタミネーション要因の詳細については、『Nextera XT Troubleshooting Technical Note』を参照してください。

出発物質を 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ~ 8.5 で希釈します。夾雑物による不完全なタグメンテーションは、ライブラリー調製の失敗やクラスター形成の不良、低品質なシーケンシングの原因となります。

## 血液および唾液のインプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep プロトコールは、新鮮全血サンプル (Flex Lysis Reagent Kit が必要) および唾液サンプルのインプットに対応します。血液と唾液に固有のプロトコールの詳細については、[20 ページの「\[オプション\] 血液の溶解」](#)または [1 ページの「DNA インプットに関する推奨事項」](#)を参照してください。

EDTA チューブの液体全血 10  $\mu$ L または Oragene チューブの唾液 30  $\mu$ L で開始する場合は、DNA インプット量 100 ng 以上で観察されるのと同様のライブラリーのノーマライゼーションを想定します。血液と唾液は不均一性の高いサンプルであるため、ノーマライズされたライブラリーを生成する Illumina DNA Prep の性能は溶解されたサンプルから得られる DNA の総量に依存します。以下の因子はキットの性能とは無関係にライブラリーのノーマライゼーションに悪い影響を及ぼします。

- 唾液サンプルの粘性
- 血液サンプルの鮮度
- 保管条件
- 白血球数に影響を及ぼす基礎疾患

# サンプルのインプットに関する推奨事項

Illumina DNA Prep のワークフローは、以下のプロトコールと試薬キットを用いた場合、血液サンプルおよび唾液サンプルに対応します。

- Illumina Blood Lysis Protocol（血液）とFlex Lysis Reagent Kit
- Illumina Saliva Lysis Protocol（唾液）

BLT PCRプログラムの推奨PCRサイクル数は、サンプルインプットの濃度と品質に基づいて調整します。詳細については、[11ページの「タグメンテーションしたDNAの増幅」](#)を参照してください。

表 1 DNAインプットに関する推奨事項

総DNAインプット量 (ng)	インプットDNA定量の推奨	ライブラリー収量のノーマライズ
1~9		
10~24		
25~49	あり	なし
50~99		
100~500	なし	あり
血液 / 唾液	なし	あり

## PCRアンプリコン

PCR アンプリコンから開始する場合、PCR アンプリコンは 150 bp を超えている必要があります。標準の精製プロトコールでは 500 bp 未満のライブラリーが除去されます。したがって、[ライブラリーの精製](#)で 500 bp 未満のアンプリコンを、上清に対して標準の体積比の 1.8 x Illumina Purification Beads で処理することを推奨します。そうしない場合、短いアンプリコンがライブラリーの精製ステップで失われる可能性があります。

タグメンテーションでは断片の遠位端にアダプターを直接付加できないため、シーケンスカバレッジは各遠位端から約 50 bp になることが予想されます。アンプリコンのターゲット領域の十分なカバレッジを確保するため、ターゲット領域を各末端で 50 bp を超えて伸長するプライマーを設計します。

# 追加リソース

イルミナウェブサイトの [Illumina DNA Prep](#) サポートページでは、ソフトウェア、トレーニングリソース、製品の互換性の情報に加えて以下の文書入手できます。常に最新バージョンのサポートページをご確認ください。

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

表 2 サンプルのインプットに関する推奨事項

リソース	説明
<a href="#">Custom Protocol Selector</a>	ライブラリー調製法、ランパラメーター、および解析方法に応じた end-to-end の手順を生成するための、詳細度を調整するオプションを備えたツール。
『Illumina DNA Prep Checklist』 (文書番号：1000000033561)	経験豊富なユーザー向けの手順チェックリストが用意されています。
『Illumina DNA Prep Consumables and Equipment List』 (文書番号：1000000033564)	ユーザー側で用意する消耗品および機器についての対話型のチェックリストが用意されています。
『Index Adapter Pooling Guide』 (文書番号：1000000041074)	10塩基対の IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes または 8塩基対の Nextera XT および Nextera XT v2 Indexes と Illumina DNA Prep Kit を使用するプーリングのガイドラインと、デュアルインデックスの方法について説明しています。
『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号：1000000002694)	イルミナシーケンステクノロジーに用いられている、イルミナ製オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が用意されています。
『Infinium HD FFPE QC Assay Protocol』 (文書番号：15020981)	FFPE サンプルの DNA インプットの品質を評価するプロトコールを示します。
『Illumina Free Adapter Blocking Reagent』 (文書番号：1000000047585)	余分な遊離アダプターをブロックしてインデックスホッピングを最小限にし、データ品質を高めるプロトコールを示します。
<a href="#">IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes サポートページ</a>	IDT for Illumina DNA/RNA Unique Dual (UD) indexes に関する情報を提供します。



# プロトコール

本章では Illumina DNA Prep プロトコールについて説明します。

- サンプルから解析までの予定された完全なシーケンスワークフローを見直し、製品の互換性および実験パラメーターを確認してください。
- 作業を進める前に、キットの内容を確認して、必要なコンポーネント、機器および消耗品が揃っていることを確認してください。このプロトコールはライブラリー調製試薬とインデックスアダプターを必要とします。インデックスアダプターは別売りです。[24ページの「サポート情報」](#)を参照してください。
- 指定の量とインキュベーションパラメーターを用いて、表示されている順序でプロトコールを実施してください。

## プーリングの準備

ライブラリーをプーリングする場合は、Illumina Experiment Manager (IEM)、Local Run Manager、または BaseSpace Sequence Hub を用いて、ライブラリー調製を開始する前にサンプルの情報を記録してください。使用するシーケンスシステムと互換性のあるツールについては、[Illumina DNA Prep Product Compatibility のページ](#)をご覧ください。

- 低プレックスのプーリング方法 (2-plex~9-plex) では、『Index Adapters Pooling Guide』 (文書番号: 1000000041074) を参照してください。
- インデックスアダプターの配列とその記録方法については、『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号: 1000000041074) を参照してください。

## ヒントおよびテクニク

プロトコールに安全なストップポイントが指定されていない限り、直ちに次の手順に進んでください。

### クロスコンタミネーションの防止

- サンプルまたはマスターミックス試薬を添加または移す場合は、サンプルごとにチップを交換してください。
- マルチチャンネルピペットでインデックスアダプターを添加する場合は、行ごとまたは列ごとにチップを交換してください。シングルチャンネルピペットを使用する場合は、サンプルごとにチップを交換してください。
- [チューブ] キャップの取り違えを防ぐため、一度に開くインデックスアダプターチューブは1つだけにします。使用しないインデックスアダプターチューブは作業台から取り除いてください。

### プレートのシール

- 96ウェルプレートは、プロトコールの以下のステップを実行する前に必ずプレートを覆い、ゴム製ローラーを用いて粘着シールでシールします。
  - シェーカーのステップ
  - サーマルサイクラーのステップ
  - 遠心機のステップ

- Microseal 'B'粘着シールは-40°C~110°Cで使用でき、スカート付きまたはセミスカート付きのPCRプレートに適しています。サーマルサイクラーの使用時や短時間の保管にはMicroseal 'B' シールを使用してください。
- Microseal 'F'ホイルシールは-70°Cまでの温度で使用でき、最終ライブラリーを長期間格納する96ウェルプレートの保管に適しています。

#### Bead-Linked Transposomes (BLT) の取り扱い

- ビーズが常にバッファー内に沈むように、BLTストックのチューブは冷蔵庫内でまっすぐに立てて保管します。
- ビーズが懸濁されるまでBLTストックのチューブを十分にボルテックスします。ビーズの再沈殿を避けるために、ピペティングの前に遠心することは推奨されません。
- ビーズが96ウェルプレートの側面または上面に付着した場合は、280 × gで3秒間遠心し、その後、ピペティングして懸濁します。
- ビーズを洗浄するとき：
  - プレートに適切な磁気スタンドを使用します。
  - 除去する指示があるまで、プレートを磁気スタンドに載せたままにします。
  - プレートを磁気スタンドに載せている間は、プレートを激しく攪拌しないでください。
  - ビーズペレットを動かさないでください。
  - ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
  - Tagment Wash Buffer (TWB) を直接ビーズ上に分注します。
  - 液体がチューブまたはウェルの側面または上面に付着した場合は、280 × gで3秒間遠心して液体に戻します。

#### インデックスプレートを次のように準備します。

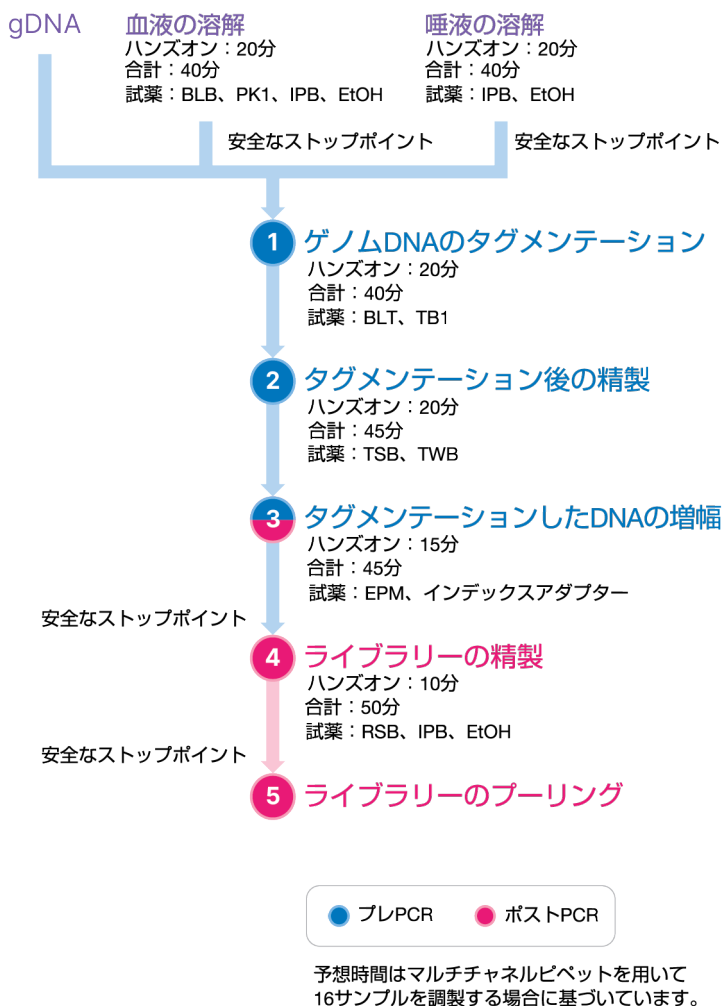
- Illumina DNA PrepはIDT® for Illumina® DNA/RNA Unique Dual (UD)、IDT for Illumina Nextera DNA Unique Dual (UD)、Nextera DNA Combinatorial Dual (CD) Indexesと互換性があります。
- 気泡の発生を最小限にするようゆっくりとピペティングします。
- 各インデックスプレートは使い切りとしてください。
- IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexesは10塩基対のインデックスコードを使用します。これは、8塩基対のインデックスコードを使用するNextera DNA CD indexesとは異なります。使用するシーケンスシステムが10塩基対のインデックスコード用に設定されていることを確認してください。
- シールから液体を取り除くために1,000 × gで1分間遠心します。
- [96サンプル未満] インデックスアダプタープレート上のホイルシールに新しいピペットチップを用いて、処理するサンプルの数だけウェルに穴を開けます。
- [96サンプル] インデックスアダプタープレートの上に新しいEppendorf製96ウェルPCRプレートを合わせ、押し下げて96ウェルすべての上のホイルシールに穿孔します。中身があふれ出ないようにゆっくり押し下げます。
- ホイルシールに穴を開けるために使用した空のEppendorf製プレートを廃棄します。

# ライブラリー調製のワークフロー

以下の図は Illumina DNA Prep のワークフローを示しています。安全なストップポイントは、ステップ間に示されています。

予想時間はマルチチャンネルピペットを用いて 16 サンプルを調製する場合に基づいています。

図 1 Illumina DNA Prepのワークフロー



# ゲノムDNAのタグメンテーション

このステップでは、Bead-Linked Transposomes (BLT) を用いて DNA をタグメンテーションします。これは DNA を断片化してアダプター配列でタグ付けするプロセスです。

## 消耗品

- Bead-Linked Transposomes (BLT)
- Tagment Buffer 1 (TB1)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96ウェルPCRプレート
- 1.7 mLマイクロチューブ
- 8チューブストリップ
- Microseal 'B'粘着シール
- ピペットチップ
  - 20  $\mu$ Lマルチチャンネルピペット
  - 200  $\mu$ Lマルチチャンネルピペット

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

## 試薬について

- BLTは2°Cより高い温度で保管してください。2°C未満の温度で保管されたeBLTを使用しないでください。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
BLT	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。ピペッティングの前に遠心しないでください。
TB1	-25°C~-15°C	室温に戻します。ボルテックスして混合します。

2. 以下のTAGプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
  - 反応量を50  $\mu$ Lに設定します。
  - 55°Cで15分間
  - 10°Cで保持します。

## 手順

1. 96ウェルPCRプレートの各ウェルに2  $\mu\text{L}$ ~30  $\mu\text{L}$ のDNAを添加して、インプットの総体積が100 ng~500 ngになるようにします。
2. DNA量が30  $\mu\text{L}$ 未満の場合、DNAサンプルにヌクレアーゼフリー水を添加して総体積が30  $\mu\text{L}$ になるようにします。
3. BLT (黄色いキャップ) を10秒間十分にボルテックスして懸濁します。必要に応じて繰り返します。
4. 以下の分量を混合し、Tagmentation Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。
  - BLT (11  $\mu\text{L}$ )
  - TB1 (11  $\mu\text{L}$ )上記の分量を合わせると1サンプルあたり22  $\mu\text{L}$ のTagmentation Master Mixとなります。正確にピペティングできるように、これには試薬が多めに含まれています。
5. Tagmentation Master Mixを十分にボルテックスして懸濁させます。
6. Tagmentation Master Mixを8チューブストリップに均等に分注します。
7. 200  $\mu\text{L}$ のマルチチャンネルピペットを用いて、20  $\mu\text{L}$ のTagmentation Master Mixを8チューブストリップからサンプルの入ったプレートの各ウェルに移します。  
サンプルの列ごとに新しいチップを使用します。
8. Tagmentation Master Mixを分注した後、8チューブストリップを廃棄します。
9. 各サンプルについてピペティングを10回行って懸濁します。
10. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、TAGプログラムを実行します。

## タグメンテーション後の精製

このステップでは、BLT 表面の、アダプターでタグ付けされた DNA を PCR 増幅前に洗浄します。

### 消耗品

- Tagment Stop Buffer (TSB)
- Tagment Wash Buffer (TWB)
- 96ウェルプレートのマグネット
- Microseal 'B'粘着シール
- ピペットチップ
  - 20  $\mu\text{L}$ マルチチャンネルピペット
  - 200  $\mu\text{L}$ マルチチャンネルピペット

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
TSB	室温	沈殿物が見られる場合は、37°Cで10分間加熱し、沈殿物が溶解するまでボルテックスします。
TWB	室温	室温で使用します。

2. 以下のPTCプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
  - 反応量を60 µLに設定します。
  - 37°Cで15分間
  - 10°Cで保持します。

## 手順

1. 10 µLのTSBをプレートに添加します。
2. ビーズが懸濁されるまで各ウェルについてゆっくりとピペティングを10回行って、その後シールします。
3. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、PTCプログラムを実行します。
4. プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。
5. マルチチャンネルピペットで上清を除去して廃棄します。
6. 次の手順で2回洗浄します。
  - a. サンプルプレートを磁気スタンドから取り外し、ゆっくりとした慎重なピペティング手技で100 µLのTWBをビーズ上に直接添加します。ゆっくりとした慎重なピペティング手技によってTWBの気泡発生が最小限になり、不正確な分量の吸引や不完全な混合が避けられます。
  - b. ビーズが十分に懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
  - c. プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。
  - d. マルチチャンネルピペットで上清を除去して廃棄します。
7. プレートを磁気スタンドから取り外し、ゆっくりとした慎重なピペティング手技で100 µLのTWBをビーズ上に直接添加します。
8. ビーズが懸濁されるまで各ウェルをゆっくりとピペティングします。
9. プレートをシールして磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約3分間）待ちます。「タグメンテーションしたDNAの増幅」の「手順」セクションのステップ4まで、磁気スタンドに載せたままにします。ビーズの過度の乾燥を防ぐため、ウェルにはTWBを残しておきます。

# タグメンテーションしたDNAの増幅

このステップでは、限定的なサイクル数のPCRプログラムを用いて、タグメンテーションしたDNAを増幅します。PCRのステップでは、インデックス1 (i7) アダプター、インデックス2 (i5) アダプター、クラスター形成のシーケンシングに必要な塩基配列を付加します。低プレックスのプーリングに選択されたインデックスが適切なカラーバランスであることを確認するには、『Index Adapters Pooling Guide』（文書番号：1000000041074）を参照してください。

このプロトコルで使用する互換性のあるインデックスアダプターの一覧については、[28 ページの「インデックスキットの内容」](#)を参照してください。

## 消耗品

- Enhanced PCR Mix (EPM)
- インデックスアダプター（チューブまたはプレート）
- ヌクレアーゼフリー水
- 1.7 mLマイクロチューブ
- Microseal 'B'粘着シール
- ピペットチップ
  - 20 µLマルチチャンネルピペット
  - 200 µLマルチチャンネルピペット

## 試薬について

- インデックスアダプタープレート
  - ウェルには10 µLより多くのインデックスアダプターが含まれている場合があります。
  - インデックスアダプタープレートにサンプルを添加しないでください。
  - インデックスプレートの各ウェルは使い切りです。
- インデックスアダプターチューブ
  - キャップの取り違えを防ぐため、一度に開くインデックスアダプターチューブは1つだけにします。あるいはチューブを開いた後、毎回新しいキャップを使用します。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
EPM	-25°C~-15°C	氷上で融解します。転倒混和した後、短時間遠心します。
インデックスアダプター	-25°C~-15°C	室温で融解します。 [チューブ] ボルテックスして混合した後、短時間遠心します。 [プレート] 使用前に軽くスピンさせます。

2. 以下のBLT PCRプログラムを、下表に示す適切なPCRサイクル数を指定してサーマルサイクラーに保存します。

- プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- 68°Cで3分間
- 98°Cで3分間
- サイクル数 (X) :
  - 98°Cで45秒間
  - 62°Cで30秒間
  - 68°Cで2分間
- 68°Cで1分間
- 10°Cで保持します。

総DNAインプット量 (ng)	PCRサイクル数 (X)
1 ~ 9	12
10 ~ 24	8
25 ~ 49	6
50 ~ 99	5
100 ~ 500	5
血液 / 唾液	5

## 手順

1. 以下の分量を混合し、PCR Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。

- EPM (22  $\mu$ L)
- ヌクレアーゼフリー水 (22  $\mu$ L)

正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。

2. PCR Master Mixをボルテックスした後、280  $\times$  gで10秒間遠心します。

3. プレートを磁気スタンドに載せたまま、200  $\mu$ Lのマルチチャンネルピペットで上清を除去して廃棄します。ウェルの側面に残る気泡はライブラリーに悪い影響を及ぼしません。



4. マグネットから外します。
5. 直ちに40  $\mu$ LのPCR Master Mixを各サンプルウェルのビーズ上に直接添加します。
6. 直ちにピペティングして混合し、ビーズが完全に懸濁されるまで続けます。あるいは、プレートをシールし、1,600 rpmで1分間プレートシェーカーで攪拌します。
7. サンプルプレートをシールし、280  $\times$  gで3秒間遠心します。
8. 適切なインデックスアダプターを各サンプルに添加します。

インデックスキットのタイプ	キットの設定	1サンプルあたりのインデックスアダプターの分量
24 プレックス (デュアルインデックス)	個々のチューブ	5 $\mu$ L i7アダプター 5 $\mu$ L i5アダプター
96プレックス (デュアルインデックス)	96ウェルプレート	10 $\mu$ Lのプレペアi7およびi5インデックスアダプター

9. 40  $\mu$ Lに設定されたピペットでピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1,600 rpmで1分間プレートシェーカーで攪拌します。
10. Microseal 'B'でプレートをシールした後、280  $\times$  gで30秒間遠心します。
11. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、BLT PCRプログラムを実行します。

## 安全なストップポイント

中断する場合は、2°C～8°Cで保管します（最長 30 日間）。

# ライブラリーの精製

このステップでは、増幅されたライブラリーを精製するためにダブルサイズセレクションのビーズ精製手順を使用します。

## 消耗品

- Illumina Purification Beads (IPB)
- Resuspension Buffer (RSB)
- 用時調製した80%エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96-well 0.8 ml Polypropylene Deepwell Storage Plate (MIDIプレート) (2)
- 96ウェルPCRプレート
- 1.7 mLマイクロチューブ
- Microseal 'B'粘着シール
- Microseal 'F'ホイルシール

## 試薬について

- Illumina Purification Beads
  - 使用前に室温にする必要があります。
  - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
  - 頻回にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
  - 溶液の粘性のため、ゆっくりと吸引し分注してください。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
IPB	室温	室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	-25℃~-15℃	融解して室温に戻します。ボルテックスして混合します。

2. 無水エタノールから80% EtOHを用時調製します。

## 手順

1. 内容物をウェルの底に集めるために280 × gで1分間遠心します。
2. プレートが磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
3. PCRプレートの各ウェルから上清45 μLを新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
4. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
5. 標準的なDNAインプットでは、次の操作を行います。
  - a. 上清の入った各ウェルにヌクレアーゼフリー水を40 μLずつ添加します。
  - b. 上清の入った各ウェルにIPBを45 μLずつ添加します。
  - c. 各ウェルについてピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1,600 rpmで1分間プレートシェーカーで攪拌します。
  - d. プレートをシールし、室温で5分間インキュベートします。
  - e. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
  - f. インキュベーション中に、IPB（希釈していないストックのチューブ）を十分にボルテックスした後、新しいMIDIプレートの各ウェルに15 μLずつ添加します。
  - g. 最初のプレートの各ウェルから上清125 μLを、希釈していないIPB 15 μLの入った新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
  - h. MIDIプレートの各ウェルについてピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1,600 rpmで1分間プレートシェーカーで攪拌します。
  - i. 最初のプレートを廃棄します。

6. PCRアンプリコンのインプット量が少ない場合は、以下のステップを実行します。
  - a. 上清の入ったMIDIプレートの各ウェルにIPBを81  $\mu$ Lずつ添加します。
  - b. 各ウェルについてピペティングを10回行って混合します。あるいは、プレートをシールし、1,600 rpmで1分間プレートシェーカーで攪拌します。
7. シールしたMIDIプレートを室温で5分間インキュベートします。
8. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約5分間）待ちます。
9. ビーズを動かさずに、上清を除去して廃棄します。
10. 次の手順で2回洗浄します。
  - a. プレートを磁気スタンドに載せたまま、用時調製した80% EtOHを混合せずに200  $\mu$ L添加します。
  - b. 30秒間インキュベートします。
  - c. ビーズを動かさずに、上清を除去して廃棄します。
11. 20  $\mu$ Lピペットで、残存するEtOHを除去して廃棄します。
12. 磁気スタンド上で5分間風乾します。
13. 磁気スタンドから外します。
14. 32  $\mu$ LのRSBをビーズに添加します。
15. ピペティングで懸濁させます。
16. 室温で2分間インキュベートします。
17. プレートを磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
18. 上清30  $\mu$ Lを新しい96ウェルPCRプレートに移します。

### 安全なストップポイント

中止する場合は、プレートを Microseal 'B' 粘着シールまたは Microseal 'F' ホイルシールでシールし、 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ で保管します（最長 30 日間）。

## ライブラリーのプーリング

DNA インプット量が 100 ng ~ 500 ng の場合、同じ実験で生成された個々のライブラリーの定量とノーマライズは必要ありません。ただし、別の実験で生成されたライブラリーの最終収量は若干異なる可能性があります。

最適なクラスター密度を達成するには、同じ体積のライブラリーをプーリングし、シーケンシングの前にプールを定量します。

### DNAインプット量100 ng~500 ng

1. 各ライブラリー（最大384ライブラリー）から5  $\mu$ Lずつを1.7 mLのマイクロチューブにまとめます。
2. ボルテックスして混合した後、遠心します。
3. QubitやPicoGreenなどのdsDNA蛍光色素法でライブラリープールを定量します。

## DNAインプット量100 ng未満

1. QubitまたはPicoGreenを用いて各ライブラリーを個別に定量します。

# ライブラリーのクオリティのチェック (オプション)

1. 以下のいずれかの手法を用いて、1  $\mu$ Lライブラリーまたはライブラリープールのクオリティを評価します。
  - ライブラリーまたはライブラリープールにRSBを1 $\mu$ L添加した後、Advanced Analytical Fragment AnalyzerとHS-NGS High Sensitivity 474キットを用いて体積2  $\mu$ Lを解析します。
  - Agilent 2100 BioanalyzerとHigh Sensitivity DNAキットを用いて1  $\mu$ Lのライブラリーまたはライブラリープールを解析します。

下図は、サイズ範囲150 bp~1,500 bpで解析したときに、平均断片サイズ600 bpの典型的なライブラリーサイズのプロファイルを示しています。

図 2 Fragment Analyzerトレースの例

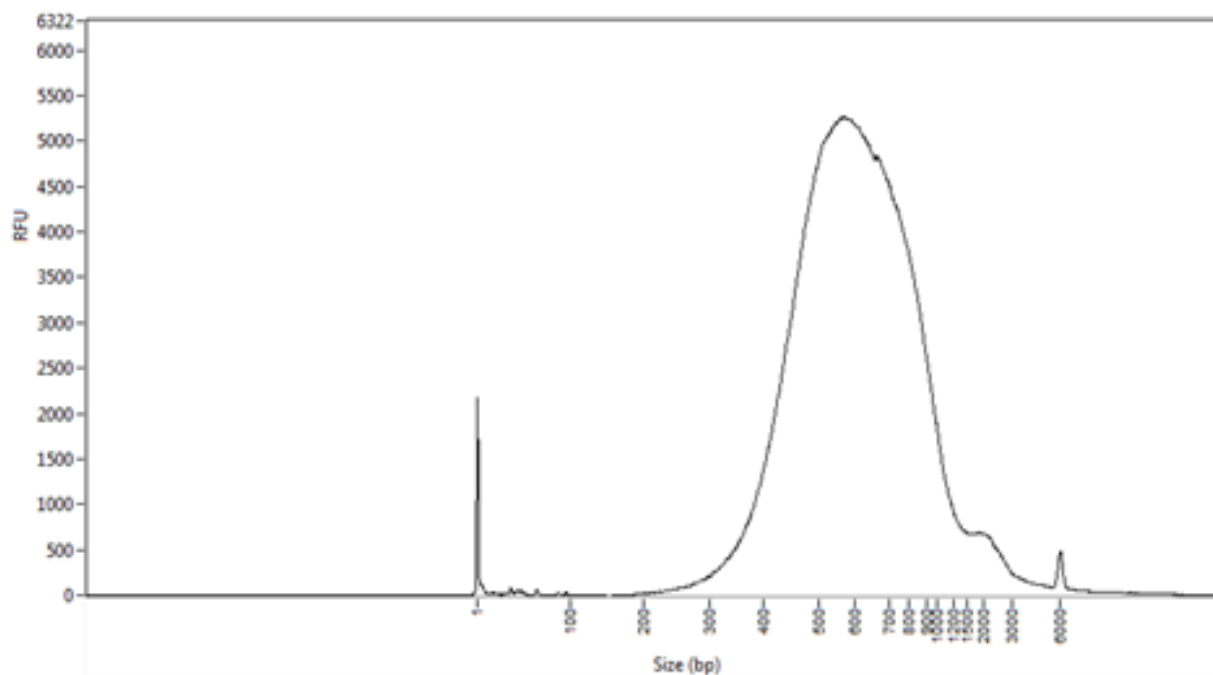
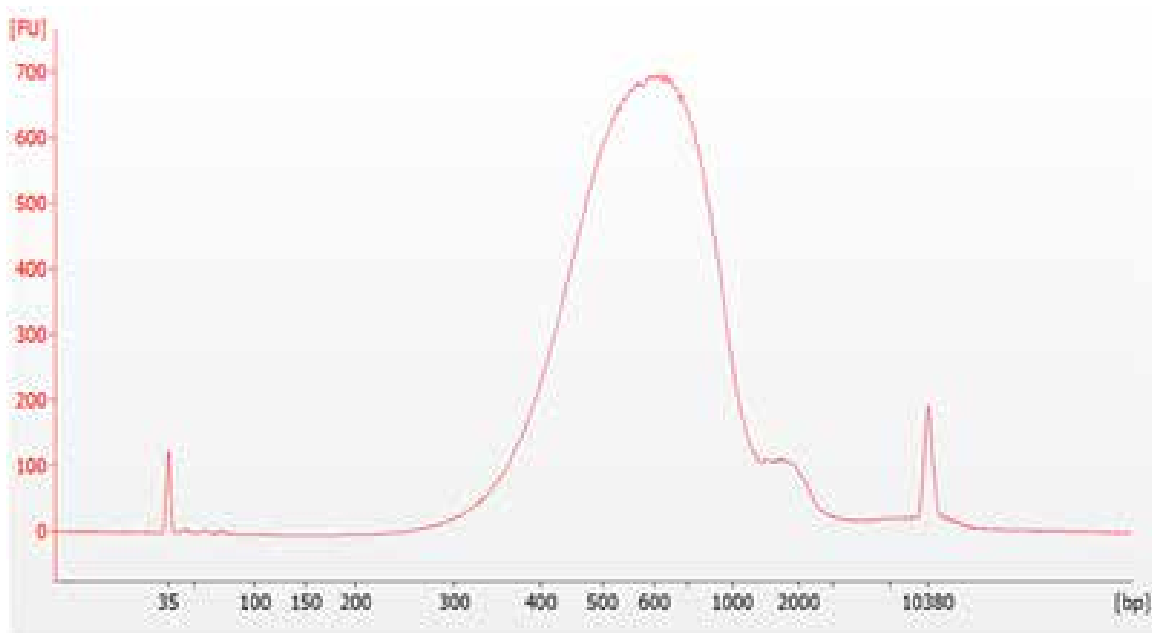


図 3 Bioanalyzerトレースの例



# ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップは、段階希釈の最初の段階であり、使用するシーケンスシステムの開始濃度にライブラリーを希釈します。開始濃度への希釈後に、ライブラリーは、変性できる状態かつ最終ローディング濃度に希釈できる状態となります。

シーケンシングについては、Illumina DNA Prep Product Compatibility サポートサイトページに示したリード長を推奨します。

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes は 10 塩基対のインデックスコードを使用します。これは、8 塩基対のインデックスコードを使用する Nextera DNA CD Indexes とは異なります。この塩基対インデックスコードの変更は、シーケンスランセットアップに合わせて調整が必要となる可能性があります。

1. 以下の式を用いて、ライブラリーまたはライブラリープールのモル濃度を算出します。

- Bioanalyzerで定性評価されたライブラリーの場合は、そのライブラリーで得られた平均サイズを使用します。
- それ以外のすべての定性評価法の場合は、600 bpを平均ライブラリーサイズとして使用します。

$$\text{Molarity} = \frac{\left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 600 \text{ bp}}$$

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

シーケンスシステム	開始濃度 (nM)	最終ローディング濃度 (pM)
HiSeq 2500/HiSeq 2000 (高出力モード)	2	12
HiSeq 2500 (Rapidランモード)	2	8.5
HiSeq X、HiSeq 4000、HiSeq 3000	2~3	200~300
iSeq 100	2	200
MiniSeq	2	1.2~1.3
MiSeq (v3試薬)	4	12
NextSeq 550/NextSeq 500	2	1.2~1.3
NextSeq 2000	2	750
NovaSeq 6000	2	『NovaSeq 6000 System Guide』 (文書番号：1000000019358) を参照

3. RSBでライブラリーを希釈します。
  - マルチプレックスライブラリープールとして定量したライブラリー：プールを使用システムの開始濃度に希釈します。
  - 個別に定量したライブラリー：各ライブラリーを使用システムの開始濃度に希釈します。希釈後の各ライブラリーから10 µLを1つのチューブにまとめ、マルチプレックスライブラリープールを作製します。
4. 使用システムの変性希釈手順に従って、最終ローディング濃度に希釈します。
  - iSeq 100システムの場合、希釈手順の詳細についてはシステムガイドを参照してください（ライブラリーは自動的に変性されます）。
  - NovaSeq 6000システムの場合、プーリングおよび変性手順の詳細についてはシステムガイドを参照してください。
  - HiSeq 4000およびHiSeq 3000システムの場合、試薬調製手順の詳細についてはcBot 2またはcBotシステムガイドを参照してください。
  - それ以外のすべてのシステムの場合は、『Denature and Dilute Libraries Guide』を参照してください。

最終ローディング濃度はあくまでも初回の目安であり、一般的なガイドラインです。その後のシーケンスランとフローセル最適濃度の検討により、使用するワークフローと定量手法に合わせて濃度を最適化してください。

# 追加の手順

このセクションでは、Illumina DNA Prep のワークフロー内の最適な手順について説明します。

## [オプション] 血液の溶解

血液サンプルのインプットと Flex Lysis Reagent Kit で Illumina DNA Prep のワークフローを実行するときは、このプロトコルを使用します。このプロトコルは EDTA コレクションチューブに採取された新鮮全血で検証済みです。血液は 4°C で保存し、3 日以内に処理します。凍結血液の使用は検証されていないため、推奨できません。

このプロトコルでは、血液溶解ステップの終了時に 100 ng を超える DNA アウトプットが生成されることが想定されます。

**!** 血液は感染症の原因となる可能性があります。施設固有の手順に従って、血液サンプルを安全に処理してください。溶解プロトコルでは、後続のステップに進む前に全血サンプルを完全に溶解します(加熱インキュベーションのステップ後、褐色に変化)。

### 消耗品

- Illumina Purification Beads (IPB)
- EDTA コレクションチューブ (採血用)
- Blood Lysis Buffer (BLB)
- Proteinase K (PK1)
- 用時調製した80%エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96ウェルPCRプレート

### 試薬について

- Illumina Purification Beads
  - 使用前に室温にする必要があります。
  - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
  - 頻回にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
  - 溶液の粘性のため、ゆっくりと吸引し分注してください。

### 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。



アイテム	保管条件	説明
BLB	室温	凍結している場合、室温で融解します。沈殿物が見られる場合は、37°Cで10分間加熱し、懸濁するまでボルテックスします。
PK1	-25°C~-15°C	必要時まで氷上に置いておきます。
IPB	室温*	室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

\*IPBはIllumina DNA Prep Kitに含まれています。

2. 無水エタノールから80% EtOHを用時調製します。
3. 以下のBLPプログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
  - 56°Cで10分間

## 手順

1. 以下の分量を混合し、Lysis Master Mixを調製します。それぞれの分量に、処理するサンプル数を乗じてください。
  - BLB (7  $\mu$ L)
  - PK1 (2  $\mu$ L)
  - ヌクレアーゼフリー水 (31  $\mu$ L)

正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
2. Lysis Master Mixをボルテックスし、遠心します。
3. EDTAチューブを10回転倒混和します。
4. 血液10  $\mu$ Lをチューブから96ウェルPCRプレートの1個のウェルに移します。
5. 各サンプルにLysis Master Mixを40  $\mu$ Lずつ添加します。
6. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
7. ウェルにIPBを20  $\mu$ L添加します。
8. 50  $\mu$ Lに設定されたピペットでゆっくりとピペティングを10回行って混合し、その後シールします。
9. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、BLPプログラムを実行します。
10. 磁気スタンドに載せ、5分間待ちます。

溶解反応後の暗褐色の血液のため、液体は透明になりません。ビーズは5分後に移動します。
11. ビーズを動かさずに、上清を除去して廃棄します。
12. ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。

13. ウェルに用時調製した80% EtOHを150  $\mu$ L添加します。
14. 磁気スタンド上で30秒間インキュベートします。
15. ピペットでEtOHを除去して廃棄します。
16. 20  $\mu$ Lピペットで、残存するEtOHをすべて除去して廃棄します。
17. プレートを磁気スタンドから取り外します。
18. ヌクレアーゼフリー水を30  $\mu$ L添加して、ピペッティングで懸濁させます。
19. 直ちに8ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」のステップ3に進むか、中止してサンプルとビーズの混合液を保存します。

#### 安全なストップポイント

8ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」に進む前に中止する場合は、プレートを Microseal 'B' 粘着シールでシールし、サンプルとビーズの混合液を 2°C ~ 8°C で保管します（最長 3 日間）。

## [オプション] 唾液の溶解

唾液サンプルのインプットで Illumina DNA Prep のワークフローを実行するときは、このプロトコールを使用します。このプロトコールは Oragene DNA Saliva コレクションチューブに採取された唾液でのみ検証済みです。唾液はコレクションチューブ内の Oragene DX Solution と混合されると、室温で安定します。

このプロトコールでは、唾液溶解ステップの終了時に 100 ng を超える DNA アウトプットが生成されることが想定されます。

**!** | 唾液は感染症の原因となる可能性があります。施設固有の手順に従って、唾液サンプルを安全に処理してください。

#### 消耗品

- Illumina Purification Beads (IPB)
- Oragene DNAコレクションチューブ（唾液サンプル採取用）
- 用時調製した80%エタノール (EtOH)
- ヌクレアーゼフリー水
- 96ウェルPCRプレート

#### 試薬について

- Illumina Purification Beads
  - 使用前に室温にする必要があります。
  - 使用前に毎回ボルテックスしてください。
  - 頻回にボルテックスし、ビーズが均等に分布していることを確認します。
  - 溶液の粘性のため、ゆっくりと吸引し分注してください。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備します。

アイテム	保管条件	説明
Oragene DNA コレクション チューブ内の唾液サンプル	室温	サンプルの調製および保存の詳細については、DNA Genotekのウェブサイトを参照してください。
IPB	室温	室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

2. 無水エタノールから80% EtOHを用時調製します。

## 手順

1. 各サンプルでは、ヌクレアーゼフリー水20  $\mu$ Lを96ウェルPCRプレートの1個のウェルに添加します。
2. 熱処理したOragene DNAコレクションチューブをボルテックスします。
3. 唾液サンプル30  $\mu$ Lをチューブから水の入ったウェルに移します。ゆっくりとピペティングして混合します。粘性の高いサンプルでは、正確にピペティングできるよう、広口径のピペットチップを使用します。
4. IPBをボルテックスし、複数回転倒混和して懸濁します。
5. ウェルにIPBを20  $\mu$ L添加します。
6. 50  $\mu$ Lに設定されたピペットでゆっくりとピペティングを10回行って混合します。
7. 室温で5分間インキュベートします。
8. 磁気スタンドに載せ、5分間待ちます。
9. ビーズを動かさずに、上清を除去して廃棄します。
10. ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
11. ウェルに用時調製した80% EtOHを150  $\mu$ L添加します。
12. 磁気スタンド上で30秒間インキュベートします。
13. 20  $\mu$ Lピペットで、残存するEtOHをすべて除去して廃棄します。
14. プレートを磁気スタンドから取り外します。
15. ヌクレアーゼフリー水を30  $\mu$ L添加して、ピペティングで懸濁させます。
16. 直ちに8ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」のステップ3に進むか、中止してサンプルとビーズの混合液を保存します。

### 安全なストップポイント

8ページの「ゲノムDNAのタグメンテーション」に進む前に中止する場合は、プレートを Microseal 'B' 粘着シールでシールし、サンプルとビーズの混合液を 2°C ~ 8°C で保管します（最長 3 日間）。

# サポート情報

本ガイドで説明したプロトコールは、ユーザーがこのセクションの内容をレビューし、プロトコールの内容を確認して、必要な消耗品および機器をすべて揃えていることを前提としています。

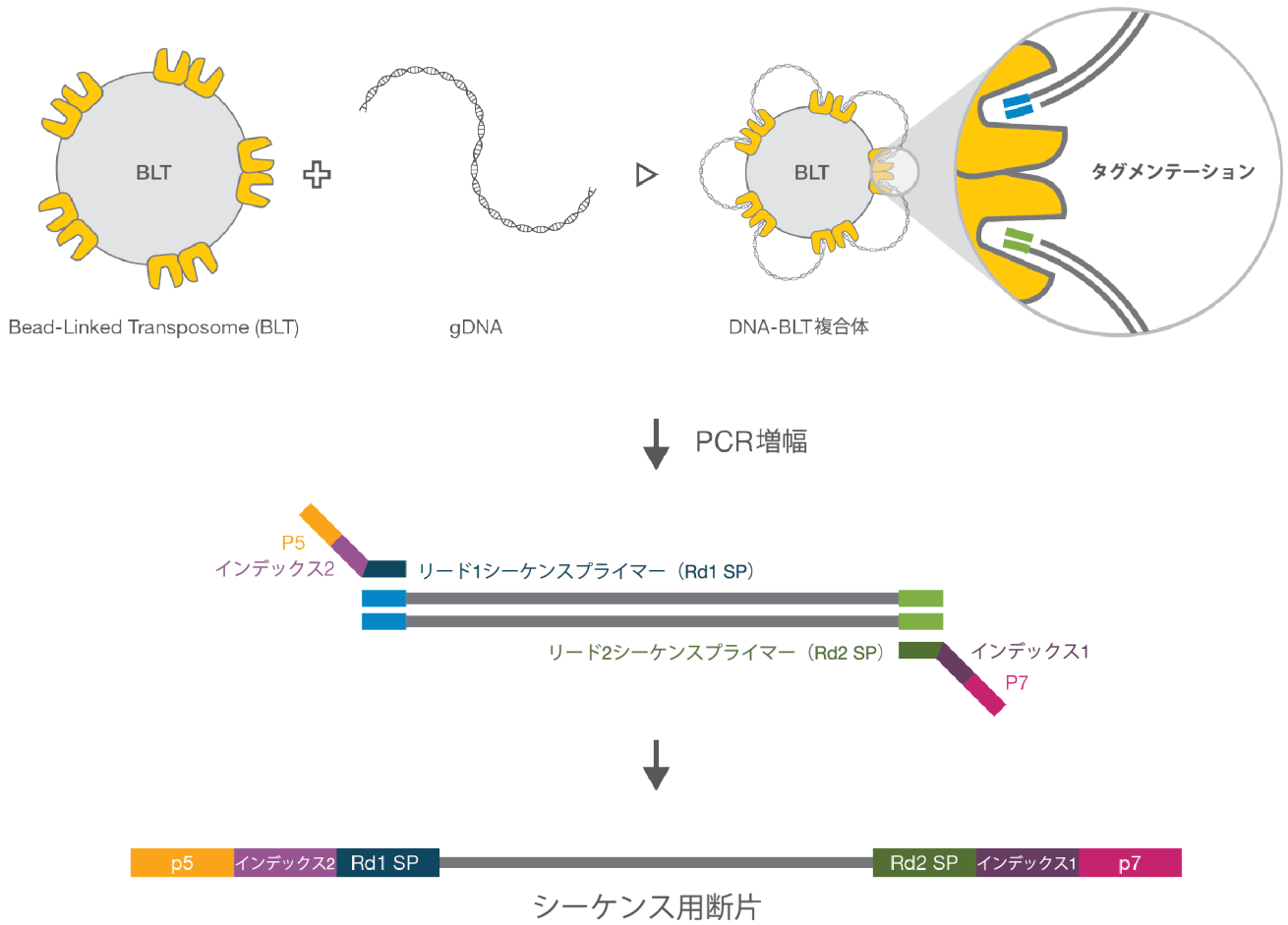
はじめに

本ガイドで説明したプロトコールは、ユーザーがこのセクションの内容をレビューし、プロトコールの内容を確認して、必要な消耗品および機器をすべて揃えていることを前提としています。

## Illumina DNA Prep アッセイの動作

Illumina DNA Prep ライブラリー調製キットは、ビーズベースのトランスポソーム複合体を用いてゲノム DNA をタグメンテーションします。これは 1 つのステップで DNA を断片化してアダプター配列でタグ付けするプロセスです。インプット DNA で飽和した後、ビーズベースのトランスポソーム複合体は一定数の DNA 分子を断片化します。このような断片化によって、幅広い DNA インプット範囲で、厳密な断片サイズ分布に一貫性のあるノーマライズされたライブラリーを生成する柔軟性が得られます。タグメンテーション後に、限定的なサイクル数の PCR によって DNA 断片の末端にアダプター配列を付加します。このステップでは、umi がイルミナの全シーケンスシステムでアッセイを使用できるようにします。その後の Illumina Purification Beads (IPB) の精製ステップで、イルミナのシーケンスシステムで使用するためにライブラリーを精製します。二本鎖 DNA ライブラリーは、ビオチンプローブのオリゴヌクレオチドプールのハイブリダイゼーション前に変性されます。

図 4 Illumina DNA Prepのワークフロー



# キットの内容

Illumina DNA Prep プロトコールの完了には、ライブラリー調製試薬とインデックスアダプターを必要とします。必要なインデックスアダプターの数は、実験に固有のインデックスの付いたサンプル数に依存します。サンプルの入力タイプとシーケンシングの要件によって、プロトコールに追加的なオプションの消耗品が必要となる場合があります。

項目	キットのオプション	カタログ番号
ライブラリー調製試薬	Illumina DNA Prep (24 Samples)	20060060
	Illumina DNA Prep (96 Samples)	20060059
インデックスアダプター <sup>1</sup>	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A (96 Indexes, 96 Samples)	20027213
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes- Set B (96 Indexes, 96 Samples)	20027214
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes- Set C (96 Indexes, 96 Samples)	20027215
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes- Set D (96 Indexes, 96 Samples)	20027216
	IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes- Set A, B, C, D (384 Indexes, 384 Samples)	20027217
	Nextera DNA CD Indexes (24 Indexes, 24 Samples)	20018707
	Nextera DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	20018708
[オプション] 血液の溶解 <sup>2</sup>	Flex Lysis Reagent Kit (96 samples)	20018706
[オプション] 追加の試薬	Illumina Adapter Blocking Reagents (12 reactions)	20024144
	Illumina Adapter Blocking Reagents (48 reactions)	20024145
[オプション] Additional Accessories for Nextera DNA CD Indexes (24 Samples)	インデックスアダプター交換キャップ、 オレンジ48個入りバッグ	15026585
	インデックスアダプター交換キャップ、 ホワイト32個入りバッグ	15026586

<sup>1</sup> インデックスキットはNextera XTインデックスキットとの互換性がありません。

<sup>2</sup> 新鮮全血サンプルからプロトコールを開始するときに必要なです。

## Illumina DNA Prepの内容

### Illumina DNA Prep—Beads and Buffers、室温で保管

これらの試薬は 2°C～8°C で出荷されます。適切な性能を確保するため、試薬は表記されているチューブ温度ですぐに保管します。

チューブの数量		略語	試薬名	保管温度
24 Samples	96 Samples			
1	1	IPB	Illumina Purification Beads	室温
1	4	TSB	Tagment Stop Buffer	室温
1	1	TWB	Tagment Wash Buffer	室温

### Illumina DNA Prep—PCR and Buffers、-25°C～-15°Cで保管

チューブの数量		略語	試薬名
24 Samples	96 Samples		
1	1	RSB	Resuspension Buffer
1	4	TB1	Tagmentation Buffer 1
1	4	EPM	Enhancement PCR Mix

### Illumina DNA Prep—Tagmentation (M) Beads、2°C～8°Cで保管

チューブの数量		略語	試薬名
24 Samples	96 Samples		
1	4	BLT	Bead-Linked Transposomes

## インデックスキットの内容

インデックスアダプターの配列については、『Illumina Adapter Sequences』（文書番号：1000000002694）を参照してください。

Nextera DNA CD Indexes (24 Indexes, 24 Samples) Tubes、-25°C～-15°Cで保管

数量	インデックス名	説明
1	H503	DNAアダプター
1	H505	DNAアダプター
1	H506	DNAアダプター
1	H517	DNAアダプター
1	H710	DNAアダプター
1	H705	DNAアダプター
1	H706	DNAアダプター
1	H707	DNAアダプター
1	H711	DNAアダプター
1	H714	DNAアダプター

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes、IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes、またはNextera DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples) Plates、-25°C～-15°Cで保管

数量	説明
1	96デュアルアダプターインデックスプレート

## Flex Lysis Reagent Kit（オプション）

これらの試薬は -25°C～-15°Cで出荷されます。適切な性能を確保するため、試薬は表記されているチューブ温度ですぐに保管します。

数量	略語	説明	保管温度
4	BLB	Blood Lysis Buffer	室温
4	PK1	Proteinase K	-25°C～-15°C

Illumina Purification Beadsは、Illumina DNA Prep 24 Samplesおよび96 Samplesキットに含まれています。



## 記号説明

次の表に、配送パッケージ、消耗品または消耗品のパッケージに関する記号を示します。

記号	説明
	箱の上方向を示します。
	内容物が壊れやすいため、取り扱いに注意が必要であることを示します。
	保管温度範囲（摂氏）。表記された範囲内で消耗品を保管してください。 <sup>1</sup>
	消耗品の使用期限。最良の結果を得るには、この日付より前に消耗品を使用してください。
	製造者（イルミナ）を示します。
	使用目的は研究に限定されます（RUO）。
	消耗品を識別することができる部品番号を示しています。 <sup>2</sup>
	消耗品が製造されたバッチまたはロットを特定するためのバッチコードを示します。 <sup>1</sup>
	注意が必要であることを示します。
	健康に有害であることを示します。

<sup>1</sup> 室温は配送温度と異なる可能性があります。

<sup>2</sup> REFは個々のコンポーネントを識別するのに対し、LOTはコンポーネントが属するロットまたはバッチを識別します。

# 消耗品および機器

プロトコールを開始する前に必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。

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

## 消耗品

消耗品	サプライヤー
10 $\mu$ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 $\mu$ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
10 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 $\mu$ L ピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
96-well 0.8 ml Polypropylene Deepwell Storage (MIDIプレート)	Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：AB-0859
Hard-Shell 96ウェルPCRプレート	Bio-Rad、カタログ番号：HSP-9601
1.7 mL マイクロチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
Microseal 'B'粘着シール	Bio-Rad、カタログ番号：MSB-1001
Microseal 'F'ホイルシール	Bio-Rad、カタログ番号：MSF-1001
RNase/DNaseフリーのマルチチャンネル試薬リザーバー (ディスポーザブル)	VWR、カタログ番号：89094-658
分子生物学用エタノール200プルーフ (純粋) (500 mL)	Sigma-Aldrich、製品番号：E7023
ヌクレアーゼフリー水	一般的なラボ用品サプライヤー
Qubit dsDNA HS Assay Kit	定量手法に応じて、以下のいずれか。 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：Q32851</li> <li>• Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：Q32854</li> </ul>

消耗品	サプライヤー
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：P11496
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：Q32856
定量手法に応じて、以下のキットのいずれか。 <ul style="list-style-type: none"> <li>• [Fragment Analyzer] High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit</li> <li>• [Bioanalyzer] Agilent High Sensitivity DNA Kit</li> </ul>	機器に応じて、以下のサプライヤーのいずれか。 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Advanced Analytical、 カタログ番号：DNF-474</li> <li>• Agilent、カタログ番号：5067-4626</li> </ul>

## 血液および唾液のインプット用の消耗品

消耗品	サプライヤー
[血液] Flex Lysis Reagent Kit	イルミナ、カタログ番号：20015884
[血液] EDTA Blood Collection tubes	Becton Dickinson
[唾液] Oragene DNA Collection Kit for Saliva	Genotek、 カタログ番号：OGR-500またはOGD-510

## 機器

機器	サプライヤー
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：AM10027
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー
微量遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
Qubit® Fluorometer 3.0	Thermo Fisher Scientific、 カタログ番号：Q33216、Q33217またはQ33218
以下の分析器のいずれか。 Advanced Analytical： <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragment Analyzer™</li> </ul> Agilent Technologies： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2100 Bioanalyzer Desktop System</li> </ul>	Advanced Analytical： <ul style="list-style-type: none"> <li>• カタログ番号についてはウェブの製品ページを参照。</li> </ul> Agilent Technologies： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 部品番号：G2940CA</li> </ul>
[唾液] ウォーターバスまたはエアークューバー、到達温度50°C	DNA Genotekによる推奨、製品ページを参照。

## サーマルサイクラー

以下の表に、推奨されるサーマルサイクラーの設定を示します。リストにないサーマルサイクラーがラボにある場合は、プロトコールを実行する前にサーマルサイクラーを検証してください。

サーマルサイクラー	温度モード	リッド温度	容器タイプ
Bio-Rad C-1000 Touch サーマルサイクラー	算出	加熱	プレート
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2	算出	加熱	ポリプロピレン製プレートおよびチューブ
MJ Research DNA Engine Tetrad	算出	加熱	プレート
Eppendorf Mastercycler Pro S	Gradient S、Simulated Tube	加熱	プレート

## 略語

略語	定義
BLT-PF	Bead Linked Transposome PCR-Free
dsDNA	二本鎖DNA
ELM	Extension Ligation Mix
EtOH	エタノール
FLP	最終ライブラリープレート
HP3	2 N NaOH
IPB	Illumina Purification Beads
LP1	ライブラリープレート1
LP2	ライブラリープレート2
MLB	Modified Lysis Buffer
PK1	Proteinase K
RSB	Resuspension Buffer
ssDNA	一本鎖DNA
ST2	Stop Tagment Buffer 2
TB1	Tagmentation Buffer 1
TWB	Tagment Wash Buffer
UD	ユニークデュアル

# 改訂履歴

文書番号	日付	変更内容
1000000025416 v10	2021年 8月	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sample Purification Beads (SPB) をIllumina Purification Beads (IPB) に変更。</li> <li>• Illumina DNA Prep (24 Samples)とIllumina DNA Prep (96 Samples)のライブラリー調製試薬の部品番号を更新。</li> <li>• モル濃度を計算する式を追加。</li> </ul>
1000000025416 v09	2020年 6月	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NextSeq 2000システムの希釈情報を追加。</li> <li>• IDT for Illumina Nextera Indexesの情報を追加。</li> </ul>
1000000025416 v08	2020年 5月	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 製品名をNextera DNA FlexからIllumina DNA Prepに変更。</li> <li>• インデックスおよび試薬キットの名前を変更。</li> <li>• UD IndexsキットSet CおよびDのカatalog番号を更新。</li> <li>• 廃止されたUD Indexes Set A~Dキットのオプションを削除。</li> <li>• 「追加リソース」を更新して、Illumina DNA Prep with Enrichmentプロトコールのみ適用される文書番号1000000070581を削除。</li> </ul>

文書番号	日付	変更内容
1000000025416 v07	2019年 5月	<ul style="list-style-type: none"><li>• IDT for Illumina Nextera Indexes Set B、C、Dに関するキット情報および調製手順などの情報を追加。</li><li>• 「追加リソース」セクションを改訂し、利用可能なリソースに関して明確化。</li><li>• 「プーリングの準備」を改訂し、プーリングの情報に関して明確化。</li><li>• TWBのピペッティング手技の情報を各ステップに追加。</li><li>• Nexteraのガイドとの全体的な整合性を保つために、文書全体の文言を明確化。</li></ul>
文書番号： 1000000025416 v06	2019年 3月	PTCプログラムのサーマルサイクラーの温度を訂正。

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 1000000025416 v05	2019年 3月	<ul style="list-style-type: none"> <li>ローディング濃度の値を訂正。</li> <li>別のワークフロー構成要素の要件について、DNA純度の評価、およびライブラリーの定量とノーマライゼーションについての情報を追加。</li> <li>『Local Run Manager Guide』を追加リソースに追加。</li> <li>タグメンテーションのステップに試薬が多めであるという情報とPTCプログラムの設定を追加。</li> <li>タグメンテーションの増幅を改訂してAMPプログラムの情報を追加し、マルチチャンネルピペットの体積を訂正。</li> <li>ワークフローの図を改訂してRSB試薬を追加。</li> <li>精製のステップを改訂して短いPCRアンプリコンと標準的なDNAインプットに別のステップを追加し、安全なストップポイントと保管の日数を訂正。</li> <li>「第3章 シーケンス」を削除。</li> <li>補足のIPBのステップをAnalytical Fragment Analyzerに追加。</li> <li>ライブラリー希釈ステップの最終ローディング濃度の改訂。</li> <li>性能を確保するため、試薬の保管温度についての情報を追加。</li> <li>コンポーネントとキットの情報の新たな表を追加し、インデックスのキットの情報を再構成。</li> <li>消耗品の表にFragment AnalyzerとBioanalyzerを追加。機器の表にFragment AnalyzerとAgilent Technologiesを追加。CDとUDの略語を追加。</li> </ul>
文書番号： 1000000025416 v04	2018年 10月	平均ライブラリーサイズを訂正。

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 1000000025416 v03	2018年 10月	<ul style="list-style-type: none"> <li>• インデックスアダプターの用語集を更新。</li> <li>• IDT® for Illumina®-Nextera™DNA UD Indexes Set A (96 Indexes, 96 Samples)を追加する更新。</li> <li>• 開始濃度への希釈の情報を更新。</li> <li>• インデックスアダプターの順序に関して明確化する説明を追加。</li> <li>• ユニークデュアルインデックスの追加リソースの情報を追加。</li> <li>• IDT® for Illumina®-Nextera™DNA UD Indexes Set A (96 Indexes, 96 Samples)およびAxygen® 1.7 mL MaxyClear Snaplock Microcentrifuge Tubesのカタログ番号の情報を追加。</li> <li>• Lysis Reagent Kitの保管情報を更新。</li> <li>• PCRアンプリコンの情報を明確化。</li> <li>• 安全な中断が選択肢となる場合の手順を明確化。</li> <li>• 各システムに推奨されるリード長をサポートサイトに移動。</li> <li>• 血液溶解と唾液溶解の消耗品をそれぞれの表に移動。</li> <li>• 段階的な手順を簡潔になるよう改訂。</li> <li>• 連続性を改善するために以下の内容を再構成。 <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNAインプットに関する推奨事項を再編成。</li> <li>• 血液溶解と唾液溶解の準備と調製手順に関する情報を移動。</li> </ul> </li> </ul>
文書番号： 1000000025416 v02	2018年 6月	PCR アンプリコンについての情報を追加。
文書番号： 1000000025416 v01	2018年 4月	『Nextera DNA Flex Pooling Guide』（文書番号：1000000031471）と『Index Adapters Pooling Guide』（文書番号：1000000041074）への参照を置き換え。プーリングの情報は、『Index Adapters Pooling Guide』に統合。
文書番号： 1000000025416 v00	2017年 10月	初版リリース。



# テクニカルサポート

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

ウェブサイト: [jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

電子メール: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## イルミナテクニカルサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	国際
アイルランド	+353 1800 936608	+353 1695 0506
イタリア	+39 800 985513	+39 236003759
インド	+918006500375	
インドネシア		0078036510048
英国	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
オーストラリア	+61 1800 775 688	
オーストリア	+43 800 006249	+43 1 9286540
オランダ	+31800 022 2493	+3120 713 2960
カナダ	+1800 809 4566	
韓国	+82 80 234 5300	
シンガポール	1800 5792 745	
スイス	+41800 200 442	+4156 580 00 00
スウェーデン	+46 2 00883979	+46 8 50619671
スペイン	+34 800 300 143	+34 911899 417
タイ	+66 1800 011304	
台湾 (中国)	+886 8 06651752	

地域	フリーダイヤル	国際
中国		+86 400 066 5835
デンマーク	+45 80 82 0183	+45 89 87 1156
ドイツ	+49 800 1014940	+49 89 3803 5677
日本	+810800 1115011	
ニュージーランド	+64 800 451650	
ノルウェー	+47 800 16 836	+47 2193 96 93
フィリピン	+63 180016510798	
フィンランド	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
フランス	+33 8 05 10 2193	+33 170 77 04 46
米国	+1800 809 4566	+1858 202 4566
ベトナム	+84 1206 5263	
ベルギー	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
香港 (中国)	+852 800 960 230	
マレーシア	+60 1800 80 6789	

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

製品関連文書: [jp.support.illumina.com](http://jp.support.illumina.com) からダウンロードできます。



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

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。  
© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®

# 正誤表

ページ番号	章・節	原文	修正内容
p.8	プロトコール ゲノム DNA のタグメンテーション	試薬について • BLT は 2℃より高い温度で保管してください。2℃未満の温度で保管された eBLT を使用しないでください。	試薬について • BLT は 2℃より高い温度で保管してください。2℃未満の温度で保管された BLT を使用しないでください。  eBLT は Illumina DNA Prep with Enrichment でしか使用されない試薬であるため、Illumina DNA Prep で使用される BLT に修正。