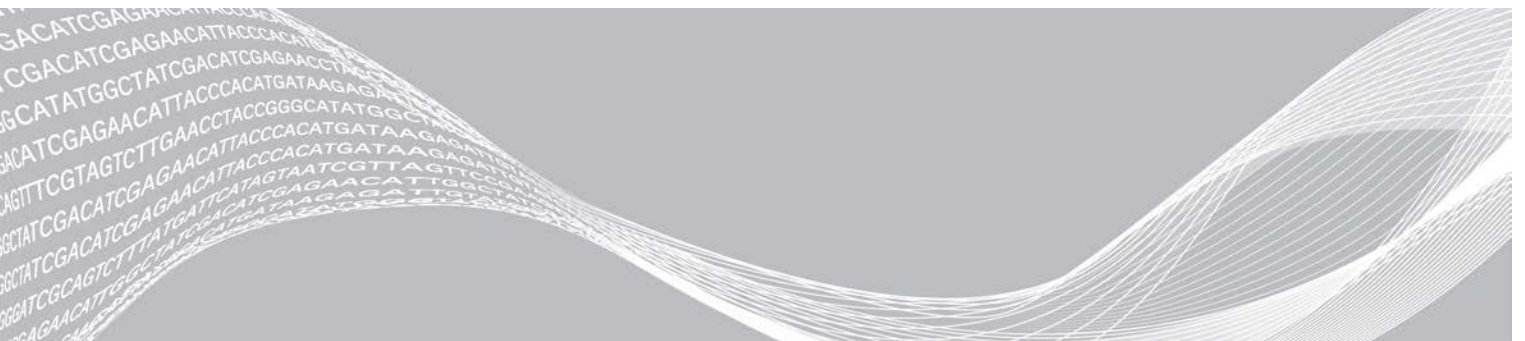


# TruSight Tumor 170

## Reference Guide



文書番号：1000000024091 v01 JPN

2017年4月

研究目的での使用に限定されます。診断での使用はできません。

ILLUMINA PROPRIETARY

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

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

本文書に含まれるすべての指示を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があります。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、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。

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, HiSeq, NextSeq, TruSightおよび流動ベースデザインは、米国および/またはその他の国におけるIllumina, Inc.および/またはその関連会社の登録済みまたは継続中の商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。

## 改訂履歴

文書	日付	変更内容
文書番号：1000000024091 v01	2017年 4月	<ul style="list-style-type: none"><li>「RNA/DNAインプットの推奨」セクションにおけるRNAサンプル評価に使用されるキットの修正。</li><li>「ライブラリーのノーマライズ」の導入部における、TruSight Tumor 170ではマニュアルノーマライゼーションが現在サポートされていないことの明確化。</li><li>消耗品リストへのAdvanced Analytical Technologies Standard Sensitivity RNA Analysis KitおよびAgilent RNA 6000 Nano Kitの追加。</li></ul>
文書番号：1000000024091 v00	2017年 3月	初版リリース

# 目次

<b>第1章 概要</b> .....	<b>1</b>
はじめに .....	1
RNA/DNAインプットの推奨 .....	1
DNA断片化の推奨 .....	2
追加リソース .....	2
<b>第2章 プロトコール</b> .....	<b>3</b>
はじめに .....	3
警告と使用上の注意 .....	4
ヒントおよびテクニック .....	4
ライブラリー調製ワークフロー .....	6
濃縮ワークフロー .....	7
RNAの変性とアニール .....	8
第1鎖cDNAの合成 .....	9
第2鎖cDNAの合成 .....	10
cDNAのクリーンアップ .....	10
gDNAの断片化 .....	12
末端修復およびA-テリングの実施 .....	14
アダプターのライゲート .....	16
ライゲーションのクリーンアップ .....	17
インデックスPCR .....	18
ハイブリダイゼーションの実施（初回） .....	20
キャプチャーの実施（初回） .....	21
ハイブリダイゼーションの実施（2回目） .....	23
キャプチャーの実施（2回目） .....	24
濃縮ライブラリーの増幅 .....	26
増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ .....	27
ライブラリーの定量化 .....	29
ライブラリーのノーマライズ .....	29
シーケンスの準備 .....	31
<b>付録A サポート情報</b> .....	<b>35</b>
はじめに .....	35
略語 .....	35
キット内容 .....	36
消耗品および機器 .....	38
<b>テクニカルサポート</b> .....	<b>41</b>

# 概要

はじめに .....	1
RNA/DNAインプットの推奨 .....	1
DNA断片化の推奨 .....	2
追加リソース .....	2

## はじめに

TruSight® Tumor 170プロトコールでは、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルから抽出したDNAおよびRNAを、Illumina®シーケンサーシステムでシーケンス可能ながん関連の遺伝子用の濃縮ライブラリーに変換するための濃縮に基づくアプローチについて記述します。TruSight Tumor 170キットにより、48ライブラリー（24のDNAおよび24のRNA）の調製を行うことができます。このキットは、170の遺伝子全体での低頻度の体細胞変異を高感度で高特異的に検出するために最適化されています。こうしたバリエーションには1塩基多型（SNV）、挿入、欠失、マルチヌクレオチドバリエーション（MNV）、増幅、融合、スプライスバリエーションなどがあります。

## 製品説明

TruSight Tumor 170 RUOキットはライブラリー調製試薬で構成されており、サンプルの核酸をシーケンスライブラリーに変換します。TruSight Tumor 170キットにはさらに、TruSight Tumor 170関連ソフトウェアが含まれます。アッセイは、インプットサンプルタイプとしてFFPE組織から抽出したDNAまたはRNAで開始されます。TruSight Tumor 170アプリには、変異コールアルゴリズムが採用されています。TruSight Tumor 170アプリにより、ターゲット遺伝子の全コーディング領域の変異（1塩基多型、マルチヌクレオチドバリエーション、indels、コピー数多型、スプライスバリエーションおよび遺伝子融合）がレポートされます。

## RNA/DNAインプットの推奨

TruSight Tumor 170アッセイは、ある定められたRNA/DNAインプット範囲に最適化されています。DNAの最適範囲は合計で40 ng~120 ng、あるいは3.3 ng/μL~10 ng/μLです。RNAの最適範囲は合計で40 ng~85 ng、あるいは4.7 ng/μL~10 ng/μLです。インプットRNA/DNAの量を測定してから、プロトコールを開始してください。十分な核酸物質を得るには、2 mm<sup>3</sup>以上のFFPE組織から核酸を分離することを推奨します。

- ▶ 高回収量が得られ、サンプル消費を最低限に抑え、サンプルの完全性を維持できる核酸抽出手法を用いてください。QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kitを使えば、このアッセイ用にテストした他の抽出方法と比較して、高収率の核酸を得ることができます。
- ▶ QuantiFluor®（RNA）またはAccuClear™（DNA）などのDNA/RNAに結合する蛍光色素を用いた蛍光定量法を用いてください。
- ▶ RNase/DNaseフリー水にRNA/DNAを希釈してください。

性能を最適化するには、TruSight Tumor 170アッセイを用いる前にDNAおよびRNAサンプルの品質を評価してください。

- ▶ DNAサンプルはIllumina FFPE QC Kitで評価することができます。
- ▶ ΔCq値が5以下になるDNAサンプルを用いてください。ΔCq値が5を超えるサンプルを用いると、アッセイ性能が低下する場合があります。
- ▶ RNAサンプルは、Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer™（Standard Sensitivity RNA Analysis Kit）か、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer（Agilent RNA 6000 Nano Kit）を用いて評価することができます。
- ▶ DV<sub>200</sub>値が20%以上になるRNAサンプルを用いてください。DV<sub>200</sub>値が20%未満のサンプルを使用すると、アッセイ性能が低下する場合があります。

## リファレンスサンプル（オプション）

- ▶ サンプル調製に際し、HorizonDxHD753（DNA）やAgilent Universal Reference RNAのような特性評価済みのリファレンス物質を用いてください。Agilent Universal Reference RNAはインタクトなRNAサンプルで、8ページの「RNAの変性とアニール」にあるインタクトなRNAのための手順に従って処理する必要があります。
- ▶ 細胞株由来の異種移植片からの認定済みのFFPE材料を、リファレンスサンプルとして用いることができます。
- ▶ RNase/DNaseフリー水はノーテンプレートコントロールとして使用してください。ノーテンプレートコントロールはシーケンスしないでください。



### 注意

リファレンスサンプルや、ノーテンプレートコントロールの処理をすると、1キットで実施可能な実サンプルの処理可能数がその分少なくなります。

## DNA断片化の推奨

TruSight Tumor 170アッセイは90~250 bp（ピークは約125 bp）に断片化されたgDNAからライブラリーを調製するために最適化されています。このアッセイは、Covaris E220evolution™またはLE220 Focused-ultrasonicatorのいずれかを12ページの「gDNAの断片化」に記載されているパラメーターで使用することで最適化されています。断片サイズの分布は、サンプル品質やこのテストで用いられる超音波破碎装置の個体差により異なる場合があります。TruSight Tumor 170（Covaris E220evolutionあるいはLE220）用に最適化された断片化手法を用いない場合は、TruSight Tumor 170サポートページを参照してください。

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

## 追加リソース

文書、ソフトウェアのダウンロード、トレーニングリソースおよび解析ソフトウェアを含むイルミナ製品の互換性に関する情報については、イルミナウェブサイトのTruSight Tumor 170キットサポートページを参照してください。

以下の文書は、イルミナのウェブサイトからダウンロードできます。

リソース	内容説明
<a href="http://jp.support.illumina.com/custom-protocol-selector.html">Custom Protocol Selector</a>	jp.support.illumina.com/custom-protocol-selector.html シーケンスランに使用するライブラリー調製法、ランパラメーター、解析手法に合わせてカスタマイズされたエンドツーエンドの文書を生成するウィザードです。
『TruSight Tumor 170 Checklist』 (文書番号：1000000024092 v00)	経験のあるユーザー向けの手順のチェックリストが用意されています。
『TruSight Tumor 170 Consumables & Equipment List』 (文書番号：1000000031408 v00)	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。

# プロトコール

はじめに	3
警告と使用上の注意	4
ヒントおよびテクニック	4
ライブラリー調製ワークフロー	6
濃縮ワークフロー	7
RNAの変性とアニール	8
第1鎖cDNAの合成	9
第2鎖cDNAの合成	10
cDNAのクリーンアップ	10
gDNAの断片化	12
末端修復およびA-テリングの実施	14
アダプターのライゲート	16
ライゲーションのクリーンアップ	17
インデックスPCR	18
ハイブリダイゼーションの実施 (初回)	20
キャプチャーの実施 (初回)	21
ハイブリダイゼーションの実施 (2回目)	23
キャプチャーの実施 (2回目)	24
濃縮ライブラリーの増幅	26
増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ	27
ライブラリーの定量化	29
ライブラリーのノーマライズ	29
シーケンスの準備	31

## はじめに

このセクションではTruSight Tumor 170プロトコールについて説明します。

- ▶ 先に進む前に、キットの内容を把握し、必要な消耗品および装置が揃っていることを確認します。詳細については、36ページの「キット内容」を参照してください。
- ▶ このプロトコールでのいくつかの試薬は関連するサンプルタイプを特定するために、キャップが色分けされています。
  - ▶ 青色キャップは、ゲノムDNA (gDNA) サンプルでのみ用いられる試薬を示します。
  - ▶ 赤色キャップは、RNAまたは相補的DNA (cDNA) サンプルでのみ用いられる試薬を示します。
- ▶ 指定のパラメーターを用いて、記載順にプロトコールを実行してください。
- ▶ ライブラリー調製の開始前に、サンプル濃度 (DNAまたはRNA) およびサンプルの品質情報を記録します。この情報は、のちのデータ解析に際して使用するために保存してください。

RNAライブラリーとDNAライブラリーは同時に調製することもできます。以下のスケジュールに従ってTruSight Tumor 170アッセイワークフローを実行することを推奨します。

- ▶ 1日目：RNAサンプルからのcDNA合成、gDNAサンプルのDNA断片化、ライブラリー調製、およびオーバーナイトハイブリダイゼーション (初回) の開始。詳しくは、6ページの「ライブラリー調製ワークフロー」を参照してください。
- ▶ 2日目：濃縮、濃縮ライブラリーQCチェック (ライブラリーの定量化)、濃縮ライブラリーのビーズベースのノーマライゼーション、およびシーケンスプラットフォーム (NextSeq® 500、NextSeq 550、またはHiSeq®2500) へのライブラリーのローディング。詳しくは、7ページの「濃縮ワークフロー」を参照してください。

前述のスケジュールに従ってTruSight Tumor 170アッセイワークフローを実行できない場合、代替スケジュールが調整できるよう、いくつかの安全なストップポイントがプロトコル全体にわたって指定されています。

## 警告と使用上の注意



### 警告

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

## ヒントおよびテクニック

プロトコルに安全なストップポイントが指定されていない場合、ただ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

- ▶ 増幅前から増幅後のエリアに移動する場合には一方向のワークフローを用いてください。
- ▶ 増幅産物やプローブキャリーオーバーを防ぐには、増幅後エリアで作業を開始した後に増幅前エリアに戻らないようにしてください。
- ▶ サンプルへの添加、または、サンプルを別ウェルに移送する場合、**ウェルごとにチップを交換**してください。
- ▶ インデックスプライマーを添加する場合、**ウェルごとにチップを交換**してください。
- ▶ 手袋がインデックスプライマー、サンプル、またはプローブに接触した場合、手袋を交換してください。
- ▶ 手順の前後に作業台をしっかりと清掃してください。
- ▶ 作業台から未使用のインデックスプライマーチューブを取り除いてください。

### プレートのシーリング

- ▶ プロトコルの以下のステップの実行前に、プレートは適切なプレートシールで必ずシールしてください。
  - ▶ 攪拌ステップ
  - ▶ ボルテックスステップ
  - ▶ 遠心ステップ
  - ▶ サーマルサイクルステップ
- ▶ 粘着シールでプレートをカバーし、ゴム製ローラーでプレートとシールを圧着させてください。
- ▶ Microseal 'B'粘着シールは-40°C~110°Cで効果があり、スカート付きまたはセミスカート付きのPCRプレートに適しています。Microseal 'B'は攪拌、遠心分離、PCR増幅、および長期保管の際に使用します。

### プレートの移送

- ▶ プレート間で溶液を移す場合、指定された容量をプレートの各ウェルから別のプレートの対応するウェルに移してください。

### 遠心分離

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



## 試薬の取扱い

- ▶ 蒸発を制限し、汚染を防ぐためには、使用直後に試薬チューブすべての蓋をしっかり締めてください。
- ▶ 手順で必要なくなった試薬は、推奨保管条件に戻してください。

## ビーズの取扱い

- ▶ ビーズ懸濁液はピペットでゆっくり添加してください。
- ▶ ピペットで移す前に十分に混合してください。
- ▶ 磁気分離ステップで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戻して、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
- ▶ ビーズを洗浄する場合：
  - ▶ プレートには適切な磁気スタンドを使用してください。
  - ▶ 液体は、ウェルの側面のビーズが濡れるように分注してください。
  - ▶ 磁気スタンド上のプレートは、取り外すよう指示されるまでそのままにしてください。
  - ▶ 磁気スタンドにプレートがある間は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。

## ライブラリー調製ワークフロー

以下の概略図により、TruSight Tumor 170キットを用いた推奨ライブラリー調製ワークフローを説明します。RNAライブラリーとDNAライブラリーは同時に調製することができます。安全なストップポイントは、ステップ間にマークされています。

図1 TruSight Tumor 170ワークフロー（パート1）



## 濃縮ワークフロー

以下の概略図により、TruSight Tumor 170キットを用いた推奨濃縮ワークフローを説明します。安全なストップポイントは、ステップ間にマークされています。

図2 TruSight Tumor 170ワークフロー（パート2）



## RNAの変性とアニール

このプロセスでは、精製されたRNAはcDNA合成に備えて変性され、ランダムヘキサマープライムされます。精製DNAのみを用いる場合は、12ページの「gDNAの断片化」に直接進んでください。

### 消耗品

- ▶ EPH3 (Elute、Prime、Fragment High Mix3 [赤色キャップ])
- ▶ FSM (First Strand Synthesis Mix [赤色キャップ])
- ▶ RVT (Reverse Transcriptase [赤色キャップ])
- ▶ 96ウェルPCRプレート
- ▶ Microseal 'B'粘着シール



#### 警告

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

### 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

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

- 2 RNAサンプルを氷上で融解します。
- 3 サンプルの定性および定量を行います。1ページの「RNA/DNAインプットの推奨」を参照してください。
- 4 精製されたRNAサンプルは、ヌクレアーゼフリー水で4.7 ng/μL~10 ng/μLの濃度になるようにそれぞれ希釈してください。
- 5 サーマルサイクラー上に次のプログラムを保存します。
  - ▶ FFPEまたは断片化されたRNAの場合は、LQ-RNAプログラムを保存します。
    - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
    - ▶ 反応量を17 μLに設定します
    - ▶ 65°C 5分間
    - ▶ 4°Cで保持
  - ▶ 細胞株または無傷のRNAの場合は、HQ-RNAプログラムを保存します。
    - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
    - ▶ 反応量を17 μLに設定します
    - ▶ 94°C 8分間
    - ▶ 4°Cで保持
- 6 新しい96ウェルのPCRプレートにCF (cDNA Fragments) のラベルを貼ります。

## 手順

- 1 遠心チューブに次の試薬を混和して、FSM+RVTマスターミックスを作製します。

マスターミックスのコンポーネント	3サンプルにつき	8サンプルにつき	16サンプルにつき	24サンプルにつき
FSM	27 $\mu$ L	72 $\mu$ L	144 $\mu$ L	216 $\mu$ L
RVT	3 $\mu$ L	8 $\mu$ L	16 $\mu$ L	24 $\mu$ L

- ▶ 3サンプル以上を調製してください。
- ▶ 使用後は残ったマスターミックスを廃棄してください。

- 2 ピペットを用いて混合します。
- 3 FSM+RVTマスターミックスは、9ページの「第1鎖cDNAの合成」まで氷上に静置します。
- 4 精製されたRNAサンプルを8.5  $\mu$ Lずつ、CFプレートの対応するウェルに添加します。
- 5 各ウェルにEPH3を8.5  $\mu$ L添加します。
- 6 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,200rpmで1分間攪拌します。
- 7 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、LQ-RNAまたはHQ-RNAプログラムを実行します。
- 8 サーマルサイクラーが4°Cになったら、次のステップにただちに進みます。

## 第1鎖cDNAの合成

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

### 消耗品

- ▶ FSM+RVTマスターミックス (8ページの「RNAの変性とアニール」で調製済み)
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

### 事前準備

- 1 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムを1stSSとして保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
  - ▶ 反応量を25  $\mu$ Lに設定します
  - ▶ 25°Cで10分間
  - ▶ 42°Cで15分間
  - ▶ 70°Cで15分間
  - ▶ 4°Cで保持

## 手順

- 1 サーマルサイクラーからCFプレートを取り出します。
- 2 使用前にピペットを用いてFSM+RVTマスターミックスを混合します。
- 3 各ウェルに8  $\mu$ LのFSM+RVTマスターミックスを添加します。
- 4 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,200rpmで1分間攪拌します。
- 5 サーマルサイクラーの上に置き、1stSSプログラムを実行します。
- 6 サーマルサイクラーが4°Cになったら、次のステップにただちに進みます。



### ヒント

DNAライブラリーも調製する場合は1stSSプログラム作動中に、gDNAの断片化を開始することができます。開始するには、12ページの「gDNAの断片化」を参照してください。

## 第2鎖cDNAの合成

このプロセスではRNAテンプレートを取り除き、ds cDNAを合成します。

### 消耗品

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

### 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

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

- 2 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムを2ndSSとして保存します。リッド温度を30°Cに設定することができない場合は、プレヒートリッドオプションをオフにします。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、30°Cに設定します
  - ▶ 反応量を50 µLに設定します
  - ▶ 16°Cで25分間
  - ▶ 4°Cで保持

### 手順

- 1 サーマルサイクラーからCFプレートを取り出します。
- 2 各ウェルにSSMを25 µL添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,200rpmで1分間攪拌します。
- 4 サーマルサイクラーの上に置き、2ndSSプログラムを実行します。
- 5 サーマルサイクラーが4°Cになったら、次のステップに進みます。

## cDNAのクリーンアップ

このプロセスでは、SPBを用いて不要な反応成分からcDNAを精製します。

### 消耗品

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



### 警告

アッセイ性能の最適化のためには、正しいプレートタイプを用いる必要があります。このステップ後にプロトコルを継続するには、MIDIプレートを用いてください。このステップ後にサンプルを保管するには、PCRプレートを用いてください。詳しくは、11ページの「事前準備」を参照してください。

## 試薬について

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

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
SPB	2°C~8°C	室温に戻します。 SPBの使用前に、1分間ボルテックスします。
RSB	2°C~8°Cまたは -25°C~-15°C	室温に戻します。 RSBが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、使用前に室温で融解しボルテックスします。

- 2 新しい96ウェルのMIDIプレートにBIND1のラベルを貼ります。
- 3 新しい96ウェルのMIDIプレートにPCF (Purified cDNA Fragments) のラベルを貼ります。
  - ▶ (オプション) このステップ後にプレートを保管するためには、新しい96ウェルのPCRプレートを使用してください。
- 4 80%のEtOHを用時調製します。

## 手順

### 結合

- 1 サーマルサイクラーからCFプレートを取り出します。
- 2 BIND1プレートの各ウェルに、SPBを90µL添加します。
- 3 CFプレートの各サンプルを50µLずつ、BIND1プレートの対応するウェルに移送します。
- 4 Microseal 'B'を貼り、1,800rpmで2分間攪拌します。
- 5 室温で5分間インキュベートします。

### 洗浄

- 1 磁気スタンドにBIND1プレートを5分間置いたままにします。
- 2 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 3 以下の要領で洗浄します。
  - a 磁気スタンド上にプレートを置いたままの状態にし、用時調製した80% EtOHを200µL添加します。
  - b 30秒待ってから、各ウェルからの上清をすべて取り除いて廃棄します。

4 ステップ3 (a~b) を繰り返して2回目の洗浄を行います。



#### 注意

アッセイ性能の最適化のためには、2回洗浄する必要があります。

5 先端が細いP20ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

#### 溶出

- 1 BIND1プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 2 各ウェルにRSBを22  $\mu$ L添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、1,500 rpmで2分間攪拌します。
- 4 室温で2分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 6 BIND1プレートの各ウェルから溶出液20  $\mu$ LをPCFプレートの対応するウェルに移送します。
- 7 PCFプレートの各ウェルにRSBを30  $\mu$ L添加し、ピペットを用いて (10回以上) 混合します。
- 8 14ページの「[末端修復およびA-テリングの実施](#)」に進むか、Microseal 'B'を貼って保管します。



#### ヒント

DNAライブラリーも調製する場合はDNAライブラリー、精製されたcDNA断片およびせん断されたDNAサンプルは同じプレートに保管することができます。ウェルにはラベルを必ずしてください。詳しくは、12ページの「[gDNAの断片化](#)」を参照してください。

#### 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280  $\times$  gで短時間遠心します。2°C~8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C~-15°Cで最大7日間保管してください。

#### gDNAの断片化

このプロセスでは、Covaris Focused-ultrasonicatorを用いて、gDNAを90~250 bpの最適な断片サイズに断片化します。Covarisせん断では、3'または5'の末端にオーバーハングを有する二本鎖DNA断片が生成されます。

精製RNAのみを使用する場合は、このステップをスキップして、14ページの「[末端修復およびA-テリングの実施](#)」に直接進んでください。

#### 消耗品

- ▶ TEB (TE Buffer)
- ▶ Covaris 8 microTUBE Strip
- ▶ 96ウェルMIDIプレート
- ▶ (オプション) 96ウェルPCRプレート



#### 警告

アッセイ性能の最適化のためには、正しいプレートタイプを用いる必要があります。このステップ後にプロトコルを継続するには、MIDIプレートを用いてください。このステップ後にサンプルを保管するには、PCRプレートを用いてください。詳しくは、13ページの「[事前準備](#)」を参照してください。





### ヒント

DNAライブラリーも調製する場合はRNAサンプルのcDNAライブラリー、精製されたcDNA断片およびせん断されたDNAサンプルはPCFプレートに保管することができます。ウェルにはラベルを必ずしてください。詳しくは、13ページの「事前準備」を参照してください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

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

- 2 Covaris装置を起動し、メーカーのガイドラインに従ってセットアップします。この装置の脱気には約1時間かかります。
- 3 次のプレートオプションのうちの1つを選択してください。
  - ▶ gDNAのみを処理するには、新しい96ウェルのMIDIプレートを使用してください。
  - ▶ cDNAサンプルを同時に処理するには、10ページの「cDNAのクリーンアップ」のPCFプレートを引き続き使用してください。
  - ▶ (オプション) このステップの後に、せん断されたgDNAを保管するには、96ウェルPCRプレートを使用してください。
- 4 3のプレートにLP (Library Preparation) のラベルを貼って (または再貼り付けして) ください。
- 5 gDNAサンプルを室温で融解します。転倒混和します。
- 6 サンプルの質や量については、1ページの「RNA/DNAインプットの推奨」を参照してください。
- 7 精製されたDNAサンプルは、TEBで3.3 ng/μL~10 ng/μLの濃度になるようにそれぞれ希釈してください。

## 手順

- 1 希釈、精製されたgDNAサンプルを12 μLずつCovaris 8 microTUBE Stripに添加します。
- 2 各サンプルにTEBを40 μL添加します。



### ヒント

LE220 Covaris装置を用いる場合は、未使用のCovaris 8 microTUBE Stripウェルに水を52 μL入れることで性能を最適化できます。

- 3 ピペットを用いて混合します。
- 4 microTUBE Stripをホイルシールで密封します。
- 5 短時間遠心します。

- 6 Covaris E220evolutionモデルまたはLE220モデルをご使用の場合は、次の設定を用いて、gDNAを断片化します。  
ご使用中のCovarisのモデルが異なる場合は、TruSight Tumor 170サポートページを参照してください。

設定	E220evolution	LE220
Peak Incident Power	175ワット	450ワット
Duty Factor	10%	30%
Cycles per Burst	200	200
Treatment Time	280秒間	250秒間
Temperature	7°C	7°C
Intensifier	あり	N/A

- 7 せん断されたgDNAサンプルそれぞれから、50 $\mu$ LをLPプレート（cDNAを同時に処理する場合はPCFプレート）の対応するウェルに移送してください。
- 8 （オプション）PCFプレートがMIDIプレートで、このステップ後に保管される予定の場合、せん断されたgDNAサンプルの50 $\mu$ LおよびcDNAの50 $\mu$ Lを新しい96ウェルPCRプレートの対応するウェルに移送してください。
- ▶ プレートにLPのラベルを貼ります。



#### ヒント

せん断されたgDNAサンプルをLPプレートに移す際、20 $\mu$ L+20 $\mu$ L+10 $\mu$ Lと、3回に分けて移すことで、先端の細いP20ピペットを使うことができます。

#### 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280 × gで短時間遠心します。2°C~8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C~-15°Cで最大7日間保管してください。

#### 末端修復およびA-テリングの実施

このプロセスでは、End Repair A-Tailing master mix (ERA1) を使用して、断片化によって生じたオーバーハングを平滑末端に変換します。このミックスの3'から5'のエクソヌクレアーゼ活性は、3'オーバーハングを取り除き、5'から3'のポリメラーゼ活性は5'オーバーハングを埋めます。3'末端はこの反応中にA-テリングされ、アダプターライゲーション反応で互いにライゲーションするのを防ぎます。

#### 消耗品

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



#### 警告

PCRプレートがgDNAおよび/またはcDNAサンプルを保管するために用いられた場合、15ページの「事前準備」のステップ4のプレート移送手順に従ってください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
ERA1-A	-25°C~-15°C	氷上に静置します。短時間遠心してから、ピペットで混合します。
ERA1-B	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。短時間遠心してから、ピペットで混合します。結晶が認められる場合、手のひらでチューブを温めてから、ピペットで混合して結晶を溶かします。

- 2 cDNAおよびせん断されたgDNAを室温に戻します。
- 3 cDNAとgDNAのサンプルが別々のMIDIプレートに保管される場合は、同じMIDIプレートにサンプルをすべて移動します。
- 4 (オプション) cDNAおよび/またはせん断されたgDNAサンプルが96ウェルPCRプレートに保管される場合、新しい96ウェルMIDIプレートの対応するウェルにcDNAおよび/またはせん断されたgDNAサンプルを50µL移送します。
- 5 MIDIプレートにLP2 (Library Preparation 2) のラベルを貼ってください (または再度貼ってください) 。
- 6 2つのHybexインキュベーターをMIDIヒートブロックインサートを用いて以下のとおりに予熱します。
  - ▶ 1つのHybexインキュベーターを30°Cに予熱します。
  - ▶ 1つのHybexインキュベーターを72°Cに予熱します。

## 手順

- 1 遠心チューブに次の試薬を混和して、ERA1マスターミックスを作製します。

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

- ▶ 3サンプル以上を調製してください。
  - ▶ 使用後は残ったマスターミックスを廃棄してください。
- 2 ピペットで混合し (10回以上) 、ERA1マスターミックスを氷上に置きます。
  - 3 LP2プレートの各サンプルに10µLのERA1マスターミックスを添加します。
  - 4 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
  - 5 30分間、30°CでHybexインキュベーター内でインキュベートします。
  - 6 72°Cの別のHybexインキュベーターにただちに移送し、20分間インキュベートします。
  - 7 氷上にプレートを5分間置いたままにします。

## アダプターのライゲート

このプロセスでは、cDNAおよび/またはgDNA断片の末端にアダプターをライゲートします。

### 消耗品

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

### 試薬について

- ▶ ALB1には高い粘着性があります。気泡ができないように、ピペットでゆっくり添加します。

### 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
ALB1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
SUA1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
STL	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LIG3	-25°C~-15°C	氷上に静置します。 短時間遠心してから、ピペットで混合します。

### 手順

- 1 各ウェルにALB1を60 µL添加します。
- 2 各ウェルにLIG3を5 µL添加します。
- 3 SUA1を10秒以上ボルテックスします。
- 4 各ウェルにSUA1を10 µL添加します。
- 5 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- 6 室温で30分間インキュベートします。
- 7 STLを5 µL添加します。
- 8 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。

## ライゲーションのクリーンアップ

このプロセスでは、SPBを用いてcDNAまたはgDNA断片を精製し、不要の産物を除去します。

### 消耗品

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

### 試薬について

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

### 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
SPB	2°C~8°C	室温に戻します。SPBの使用前に、1分間ボルテックスします。
RSB	2°C~8°Cまたは -25°C~-15°C	室温に戻します。 RSBが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、使用前に室温で融解しボルテックスします。

- 2 新しい96ウェルのPCRプレートにLS (Library Samples) のラベルを貼ります。
- 3 80%のEtOHを用時調製します。

### 手順

#### 結合

- 1 112 µLのSPBをLP2プレートの各ウェルに添加します。
- 2 Microseal 'B'を貼り、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 3 室温で5分間インキュベートします。

#### 洗浄

- 1 磁気スタンドにLP2プレートを10分間置いたままにします。
- 2 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 3 以下の要領で洗浄します。
  - a 磁気スタンド上にプレートを置いたままの状態にし、用時調製した80% EtOHを200 µL添加します。
  - b 30秒待ってから、各ウェルからの上清をすべて取り除いて廃棄します。

4 ステップ3 (a~b) を繰り返して2回目の洗浄を行います。



#### 注意

アッセイ性能の最適化のためには、2回洗浄する必要があります。

5 先端が細いP20ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

#### 溶出

- 1 磁気スタンドから外します。
- 2 各ウェルにRSBを27.5 µL添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、1,500 rpmで2分間攪拌します。
- 4 室温で2分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 6 LP2プレートの各溶出液を25 µLずつ、LSプレートの対応するウェルに移送します。

## インデックスPCR

このステップでは、サンプルマルチプレックスを行うために、インデックスシーケンスを追加するプライマーを用いて、cDNA断片および/またはgDNA断片を増幅します。結果として生じる産物は、クラスター形成に必要なシーケンスとアダプターを両端に持つDNA断片となります。

#### 消耗品

- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ UPXX (Unique Index Primer Mixes) 。36ページの「キット内容」を参照してください。
- ▶ CPXX (Combinatorial Index Primer Mixes) 。36ページの「キット内容」を参照してください。
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

#### 事前準備

1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
EPM	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
UPXX	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
CPXX	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 RNAライブラリーあたり1つのUPXXインデックスプライマーミックス、DNAライブラリーあたり1つのCPXXインデックスプライマーミックスを割り当てます (XX=インデックスプライマーミックス番号) 。
  - ▶ UPXXインデックスプライマーミックスは、DNAライブラリーの処理に用いることができます。
  - ▶ CPXXインデックスプライマーミックスは、RNAライブラリーには使えません。
  - ▶ プレックス数が少ないランの場合、十分な多様性を確保するため、少なくとも3種のライブラリーを含むべきであり、その組み合わせは以下に示したUPXXインデックスプライマーセットのいずれかにすることを推奨します。

ブックス数が少ないランには、次のインデックスプライマーセットのうちの1つを選んでください。

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

詳細については、36ページの「キット内容」を参照してください。



**警告**

単一フローセルで複数のライブラリーをシーケンスする場合、各ライブラリーサンプルに異なるインデックスプライマーミックスを割り当ててください。



**警告**

インデックスプライマーを取り扱う場合、クロスコンタミネーションが発生しないようにしてください。インデックスプライマーミックスチューブを開けたら、元のチューブキャップは廃棄して、新しいチューブキャップを使用してください。



**警告**

RNAライブラリーにのみUPXXインデックスプライマーミックス必ず割り当ててください。RNAライブラリーにCPXXインデックスプライマーミックスを割り当てると、性能の低下を招く恐れがあります。

- 3 増幅後のエリアでは、ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムをI-PCRとして保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
  - ▶ 反応量を50 µLに設定します
  - ▶ 98°C 30秒間
  - ▶ 以下を15サイクル：
    - ▶ 98°C 10秒間
    - ▶ 60°C 30秒間
    - ▶ 72°C 30秒間
  - ▶ 72°C 5分間
  - ▶ 10°Cで保持

## 手順

- 1 5 µLのインデックスプライマーミックス（UPXXまたはCPXX）をLSプレートの各ウェルに添加します。（インデックスプライマーミックスについて詳しくは、18ページの「事前準備」を参照してください。）
- 2 各ウェルにEPMを20 µL添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,500 rpmで1分間攪拌します。



**警告**

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

- 4 280 × gで短時間遠心します。
- 5 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、I-PCRプログラムを実行します。
- 6 I-PCRプログラムが終了したら、プレートにALS（Amplified Library Samples）のラベルを貼ります。
- 7 短時間遠心します。

## 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280 × gで短時間遠心します。2°C～8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C～-15°Cで最大30日間保管してください。

## ハイブリダイゼーションの実施（初回）

このプロセスで、TruSight Tumor 170のターゲットの170の遺伝子に特有のオリゴのプールは、18ページの「インデックスPCR」で生成されたRNAおよび/またはDNAライブラリーにハイブリダイズされます。2回のハイブリダイゼーションステップが、対象領域を確実に濃縮するために必要です。このステップで、初回のハイブリダイゼーションはオーバーナイト（8時間～24時間）行われます。

## 消耗品

- ▶ TCA1（Target Capture Additives 1）
- ▶ TCB1（Target Capture Buffer 1）
- ▶ OPR1（Oncology Probes RNA 1 [赤色キャップ]）
- ▶ OPD1（Oncology Probes DNA 1 [青色キャップ]）
- ▶ 96ウェルPCRプレート
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

## 試薬について

- ▶ RNAライブラリーにのみOPR1を使用します（赤色キャップ）。
- ▶ DNAライブラリーにのみOPD1を使用します（青色キャップ）。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
TCB1	2°C～8°C	室温に戻します。1分間ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。結晶が認められる場合は手のひらでチューブを温め、その後、ボルテックスして結晶を溶解します。
TCA1	-25°C～-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPR1	-25°C～-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPD1	-25°C～-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 ALSプレートが-25°C～-15°Cで保管されていた場合は、室温で融解し遠心します。
- 3 新しい96ウェルのPCRプレートにHYB1（Hybridization 1）のラベルを貼ります。
- 4 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムをHYB1として保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
  - ▶ 反応量を50 µLに設定します
  - ▶ 95°C 10分間
  - ▶ 85°C 2.5分間
  - ▶ 75°C 2.5分間
  - ▶ 65°C 2.5分間
  - ▶ 57°Cで保持



## 手順

- 1 RNAおよび/またはDNAライブラリーを20  $\mu$ LずつHYB1プレートに添加します。
- 2 各ウェルにTCB1を15  $\mu$ L添加します。
- 3 各ウェルにTCA1を10  $\mu$ L添加します。
- 4 以下に示す適切なプローブを添加します。
  - ▶ RNAライブラリーには、OPR1（赤色キャップ）を5  $\mu$ L添加します。
  - ▶ DNAライブラリーには、OPD1（青色キャップ）を5  $\mu$ L添加します。
- 5 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- 6 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、HYB1プログラムを実行します。57°Cでオーバーナイトハイブリダイズします（最短8時間～最長24時間）。

## キャプチャーの実施（初回）

このステップでは、SMB（Streptavidin Magnetic Beads）を用いて、対象領域にハイブリダイズされたプローブをキャプチャーします。EEW2を用いて、加熱下で3回洗浄することで、ビーズから非特異的な結合を除去することができます。濃縮されたライブラリーがビーズから溶出後、ハイブリダイゼーションの第2ラウンド用に調製されます。

## 消耗品

- ▶ SMB（Streptavidin Magnetic Beads）
- ▶ ET2（Elute Target Buffer 2）
- ▶ EE2（Enrichment Elution 2）
- ▶ HP3（2N NaOH）
- ▶ EEW2（Enhanced Enrichment Wash 2）
- ▶ 96ウェルMIDIプレート
- ▶ 96ウェルPCRプレート
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

## 試薬について

- ▶ この手順では、**SPBではなく、SMBを必ず**使用してください。
- ▶ SMBを頻繁にボルテックスしてビーズを確実に懸濁します。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
EE2	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
EEW2	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。1分間ボルテックスして懸濁します。
SMB	2°C~8°C	室温に戻します。1分間ボルテックスします。 ビーズペレットがある場合、上下にピペットしてペレットをリリースした後、ボルテックスして懸濁します。

アイテム	保管条件	手順
ET2	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
HP3	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- MIDIヒートブロックインサートを用いて、Hybexインキュベーターを57°Cに予熱します。
- 新しい96ウェルのMIDIプレートにCAP1のラベルを貼ります。
- 新しい96ウェルのPCRプレートにELU1 (Elution 1) のラベルを貼ります。

## 手順

### 結合

- サーマルサイクラーからHYB1プレートを取り出します。
- CAP1プレートの各ウェルに、SMBを150µL添加します。
- HYB1プレートの各ライブラリーから50µLをCAP1プレートの対応するウェルに移します
- Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- Hybexインキュベーターを使用して、57°Cで25分間インキュベートします。
- 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のままにし、ピペットを用いて上清を除去し廃棄します。

### 洗浄

- 以下の要領で洗浄します。
  - CAP1プレートを磁気スタンドから取り外します。
  - 各ウェルにEEW2を200µL添加します。
  - 5回ピペットして混合します。各ライブラリーに新しいチップを使用します。
  - Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで4分間攪拌します。  
ビーズペレットが残っている場合は、Microsealを取り外しピペットで混合して、ビーズがすべて懸濁されていることを確認します。新しいMicroseal 'B'を貼ります。
  - Hybexインキュベーターを使用して、57°Cで5分間インキュベートします。
  - 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
  - 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のままにし、ピペットを用いて上清を各ウェルから除去し廃棄します。
- ステップ1 (a~g) を繰り返して2回目の洗浄を行います。
- ステップ1 (a~g) を繰り返して3回目の洗浄を行います。



#### 注意

アッセイ性能の最適化のためには、3回洗浄する必要があります。

- 先端が細いP20ピペットを用いて、すべての残った上清を各ウェルから除去します。

## 溶出

- 1 遠心チューブ内で次の試薬を混和して、EE2+HP3の溶出液ミックスを作製します。

溶出液ミックスのコンポーネント	3サンプルにつき	8サンプルにつき	16サンプルにつき	24サンプルにつき
EE2	95 $\mu$ L	228 $\mu$ L	456 $\mu$ L	684 $\mu$ L
HP3	5 $\mu$ L	12 $\mu$ L	24 $\mu$ L	36 $\mu$ L

- ▶ 3サンプル以上を調製してください。
- ▶ 使用後に残った溶出液ミックスを廃棄します。

- 2 短時間ボルテックスして混合します。
- 3 CAP1プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 4 各サンプルペレットにEE2+HP3溶出液ミックス17  $\mu$ Lを添加します。
- 5 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- 6 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 7 CAP1プレートの各ウェルの溶出液15  $\mu$ LをELU1プレートに慎重に移します。



### 警告

移す溶出液が指定量未満の場合、アッセイ性能に影響を及ぼす可能性があります。

- 8 5  $\mu$ LのET2をELU1プレートの各溶出液に添加します。
- 9 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。

## ハイブリダイゼーションの実施（2回目）

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

## 消耗品

- ▶ TCA1 (Target Capture Additives 1)
- ▶ TCB1 (Target Capture Buffer 1)
- ▶ OPR1 (Oncology Probes RNA 1 [赤色キャップ])
- ▶ OPD1 (Oncology Probes DNA 1 [青色キャップ])
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

## 試薬について

- ▶ RNAライブラリーにのみOPR1を使用します（赤色キャップ）。
- ▶ DNAライブラリーにのみOPD1を使用します（青色キャップ）。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
TCB1	2°C~8°C	室温に戻します。1分間ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。結晶が認められる場合は手のひらでチューブを温め、その後、ボルテックスして結晶を溶解します。
TCA1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPR1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
OPD1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムをHYB2として保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
  - ▶ 反応量を50 µLに設定します
  - ▶ 95°C 10分間
  - ▶ 85°C 2.5分間
  - ▶ 75°C 2.5分間
  - ▶ 65°C 2.5分間
  - ▶ 57°Cで保持

## 手順

- 1 15 µLのTCB1をELU1プレートの各ウェルに添加します。
- 2 各ウェルにTCA1を10 µL添加します。
- 3 以下に示す適切なプローブを添加します。
  - ▶ RNAライブラリーには、OPR1（赤色キャップ）を5 µL添加します。
  - ▶ DNAライブラリーには、OPD1（青色キャップ）を5 µL添加します。
- 4 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- 5 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、HYB2プログラムを実行します。57°Cで最短1.5時間~最長4時間ハイブリダイズします。

## キャプチャーの実施（2回目）

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

## 消耗品

- ▶ SMB（Streptavidin Magnetic Beads）
- ▶ ET2（Elute Target Buffer 2）
- ▶ EE2（Enrichment Elution 2）
- ▶ HP3（2N NaOH）
- ▶ RSB（Resuspension Buffer）
- ▶ 96ウェルMIDIプレート

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

## 試薬について

- ▶ この手順では、**SPBではなく、SMB**を必ず使用してください。
- ▶ SMBを頻繁にボルテックスしてビーズを確実に懸濁します。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
EE2	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
SMB	2°C~8°C	室温に戻します。1分間ボルテックスします。ビーズペレットがある場合、上下にピペットしてペレットをリリースした後、ボルテックスして懸濁します。
ET2	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
HP3	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
RSB	2°C~8°Cまたは -25°C~-15°C	室温に戻します。 RSBが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、使用前に室温で融解しボルテックスします。

- 2 MIDIヒートブロックインサートを用いて、Hybexインキュベーターを57°Cに予熱します。
- 3 新しい96ウェルのMIDIプレートにCAP2のラベルを貼ります。
- 4 新しい96ウェルのPCRプレートにELU2 (Elution 2) のラベルを貼ります。

## 手順

### 結合

- 1 サーマルサイクラーからELU1プレートを取り出します。
- 2 CAP2プレートの各ウェルに、SMBを150 µL添加します。
- 3 ELU1プレートの各ライブラリーを50 µLずつ、CAP2プレートの対応するウェルに移します。
- 4 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 5 Hybexインキュベーターを使用して、57°Cで25分間インキュベートします。
- 6 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 7 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のままにし、ピペットを用いて上清を各ウェルから慎重に除去し廃棄します。

### 洗浄

- 1 CAP2プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 2 各ウェルにRSBを200 µL添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800 rpmで4分間攪拌します。  
ビーズペレットが残っている場合は、Microsealを取り外しピペットで混合して、ビーズがすべて懸濁されていることを確認します。新しいMicroseal 'B'を貼ります。

- 4 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 5 磁気スタンド上にプレートを置いた状態のままにし、ピペットを用いて上清を慎重に除去し廃棄します。
- 6 先端が細いP20ピペットを用いて、すべての残った上清を各ウェルから除去します。

## 溶出

- 1 遠心チューブ内で次の試薬を混和して、EE2+HP3の溶出液ミックスを用時調製します。

溶出液ミックスのコンポーネント	3サンプルにつき	8サンプルにつき	16サンプルにつき	24サンプルにつき
EE2	95 $\mu$ L	228 $\mu$ L	456 $\mu$ L	684 $\mu$ L
HP3	5 $\mu$ L	12 $\mu$ L	24 $\mu$ L	36 $\mu$ L

- ▶ 3サンプル以上を調製してください。
- ▶ 使用後に残った溶出液ミックスを廃棄します。

- 2 ボルテックスして混合します。
- 3 CAP2プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 4 各サンプルペレットにEE2+HP3溶出液ミックス22  $\mu$ Lを添加します。
- 5 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。
- 6 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- 7 CAP2プレートの各ウェルの溶出液20  $\mu$ LをELU2プレートに移送します。



### 警告

移す溶出液が指定量未満の場合、アッセイ性能に影響を及ぼす可能性があります。

- 8 5  $\mu$ LのET2をELU2プレートの各溶出液に添加します。
- 9 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,800rpmで2分間攪拌します。

## 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280 × gで短時間遠心します。2°C~8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C~-15°Cで最大7日間保管してください。

## 濃縮ライブラリーの増幅

このステップでは、プライマーを用いて濃縮ライブラリーを増幅します。

## 消耗品

- ▶ PPC3 (PCR Primer Cocktail 3)
- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ Microseal 'B'粘着シール

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
EPM	-25°C~-15°C	氷の上で融解します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
PPC3	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 ELU2プレートが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、室温で融解し遠心します。
- 3 ヒートリッド機能付きのサーマルサイクラーに以下のプログラムをEL-PCRとして保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します
  - ▶ 反応量を50 µLに設定します
  - ▶ 98°C 30秒間
  - ▶ 以下を18サイクル：
    - ▶ 98°C 10秒間
    - ▶ 60°C 30秒間
    - ▶ 72°C 30秒間
  - ▶ 72°C 5分間
  - ▶ 10°Cで保持

## 手順

- 1 5 µLのPPC3をELU2プレートの各ウェルに添加します。
- 2 各ウェルにEPMを20 µL添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、プレートを1,500 rpmで2分間攪拌します。
- 4 280 × gで短時間遠心します。
- 5 サーマルサイクラーの上に置き、EL-PCRプログラムを実行します。

## 増幅された濃縮ライブラリーのクリーンアップ

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

## 消耗品

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

## 試薬について

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

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
SPB	2°C~8°C	室温に戻します。SPBの使用前に、1分間ボルテックスします。

アイテム	保管条件	手順
RSB	2°C~8°Cまたは -25°C~-15°C	室温に戻します。 RSBが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、使用前に室温で融解しボルテックスします。

- 新しい96ウェルのMIDIプレートにBIND2のラベルを貼ります。
- 新しい96ウェルのPCRプレートにPL (Purified Libraries) のラベルを貼ります。
- 80%のEtOHを用時調製します。

## 手順

### 結合

- サーマルサイクラーからELU2プレートを取り出します。
- BIND2プレートの各ウェルに、SPBを110 µL添加します。
- ELU2プレートの各ライブラリーを50 µLずつ、BIND2プレートの対応するウェルに移送します。
- Microseal 'B'を貼り、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 室温で5分間インキュベートします。

### 洗浄

- 磁気スタンドにBIND2プレートを5分間置いたままにします。
- 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 以下の要領で洗浄します。
  - 磁気スタンド上にプレートを置いたままの状態にし、用時調製した80% EtOHを200 µL添加します。
  - 30秒待ってから、各ウェルからの上清をすべて取り除いて廃棄します。
- ステップ3 (a~b) を繰り返して2回目の洗浄を行います。



### 注意

アッセイ性能の最適化のためには、2回洗浄する必要があります。

- 先端が細いP20ピペットを用いて、残った上清を各ウェルから除去します。

### 溶出

- BIND2プレートを磁気スタンドから取り外します。
- 各ウェルにRSBを32 µL添加します。
- Microseal 'B'を貼り、1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 室温で2分間インキュベートします。
- 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
- BIND2プレートの各溶出液を30 µLずつ、PLプレートの対応するウェルに移送します。

### 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280 × gで短時間遠心します。2°C~8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C~-15°Cで最大30日間保管してください。



## ライブラリーの定量化

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

## 推奨ガイドライン

- 1 蛍光定量化キットに付属のDNA標準、ライブラリー、およびブランク溶液はすべて、トリPLICATE（3重）でランしてください。
- 2 平均の相対蛍光単位（RFU）をそれぞれ測定してください。
- 3 次の値を計算してください。
  - ▶ 平均標準RFU - 平均ブランクRFU = 正規化標準RFU
  - ▶ 平均ライブラリーRFU - 平均ブランクRFU = 各ライブラリーの正規化RFU

## 量の評価

次の基準に対して各ライブラリーの結果として生じる正規化RFUを評価します。

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

## ライブラリーのノーマライズ

このプロセスでは、ビーズベースのノーマライゼーションを用いて、プールされたライブラリーにおいて、各ライブラリーが、確実に均一に存在するよう、各ライブラリー量をノーマライズします。

マニュアルでのライブラリーノーマライゼーションは、TruSight Tumor 170では現在サポートされていません。ライブラリーをマニュアルでノーマライズしたい場合は、イルミナテクニカルサポートに連絡してください。

## 消耗品

- ▶ LNA1 (Library Normalization Additives 1)
- ▶ LNB1 (Library Normalization Beads 1)
- ▶ LNW1 (Library Normalization Wash 1)
- ▶ LNS2 (Library Normalization Storage 2)
- ▶ HP3 (2N NaOH)
- ▶ PCRグレード水
- ▶ 96ウェルPCRプレート
- ▶ 96ウェルMIDIプレート

- ▶ Microseal 'B'粘着シール
- ▶ 1.7 mL遠心チューブ (2本)

## 試薬について

- ▶ LNB1は頻繁にボルテックスしてビーズを均等に分散させてください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	手順
LNA1	-25°C~-15°C	融解し室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LNS2	15°C~30°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。
LNB1	2°C~8°C	室温に戻します。1分間ボルテックスして確実にビーズを均等に分布させます。LNB1を上下にピペットして、確実に懸濁させます。
LNW1	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。
HP3	2°C~8°C	室温に戻します。ボルテックスして懸濁します。短時間遠心します。

- 2 PLプレートが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、室温で融解しプレートを遠心します。
- 3 新しい96ウェルのMIDIプレートにBIND3のラベルを貼ります。
- 4 新しい96ウェルのPCRプレートにNL (Normalized Libraries) のラベルを貼ります。

## 手順

- 1 新しい遠心チューブに次の試薬を混和して、LNA1+LNB1マスターミックスを作製します。

マスターミックスのコンポーネント	3サンプルにつき	8サンプルにつき	16サンプルにつき	24サンプルにつき
LNA1	132 µL	352 µL	704 µL	1,056 µL
LNB1	24 µL	64 µL	128 µL	192 µL

- 2 ボルテックスして混合します。
- 3 新しい遠心チューブに次の試薬を混和して、0.1 N NaOH溶液を用時調製します。

溶液コンポーネント	3サンプルにつき	8サンプルにつき	16サンプルにつき	24サンプルにつき
PCRグレード水	114 µL	304 µL	608 µL	912 µL
HP3	6 µL	16 µL	32 µL	48 µL

- 4 ボルテックスして混合します。

## 結合

- 1 BIND3プレートの各ウェルにLNA1+LNB1マスターミックスを45 µL添加します。
- 2 PLプレートの各ライブラリーを20 µLずつ、BIND3プレートの対応するウェルに添加します。
- 3 Microseal 'B'を貼り、1,800 rpmで10分間攪拌します。
- 4 磁気スタンドにBIND3プレートを2分間置いたままにします。
- 5 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。

## 洗浄

- 1 以下の要領で洗浄します。
  - a BIND3プレートを磁気スタンドから取り外します。
  - b 各ウェルにLNW1を45  $\mu$ L添加します。
  - c Microseal 'B'を貼り、1,800rpmで2分間攪拌します。
  - d 磁気スタンドに2分間置いたままにします。
  - e 各ウェルから上清をすべて取り除き、廃棄します。
- 2 ステップ1 (a~e) を繰り返して2回目の洗浄を行います。



### 注意

アッセイ性能の最適化のためには、2回洗浄する必要があります。

- 3 先端が細いP20ピペットを用いて、すべての残った上清を各ウェルから除去します。

## 溶出

- 1 各ウェルに0.1 N NaOH溶液を32  $\mu$ L添加します。
- 2 Microseal 'B'を貼り、1,800rpmで2分間攪拌します。
- 3 磁気スタンドにBIND3を2分間置きます。
- 4 BIND3プレートの各溶出液を30  $\mu$ Lずつ、NLプレートの対応するウェルに移送します。
- 5 30  $\mu$ LのLNS2をNLプレートの各ライブラリーに添加します。
- 6 上下にピペットして混合します。

## 安全なストップポイント

停止する場合は、Microseal 'B'をPCRプレートに貼り、280  $\times$  gで短時間遠心します。2°C~8°Cでオーバーナイト、あるいは-25°C~-15°Cで最大30日間保管してください。

## シーケンスの準備

次の手順を用いて、NextSeq SystemでTruSight Tumor 170のシーケンスを行うときのクラスター密度を最適化します。

- ▶ ランあたり16ライブラリー（8DNAおよび8RNA）をシーケンスして、各サンプルのカバレッジを最大化します。
- ▶ DNAライブラリーのみをシーケンスする場合は、10サンプル以下にします。
- ▶ RNAライブラリーのみをシーケンスする場合は、16サンプル以下にします。
- ▶ （オプション）アライメントとエラー率の計算用のポジティブコントロールとして低濃度のPhiX Controlスパイクインを添加します。詳しくは、イルミナウェブサイトのPhiX Control v3サポートページを参照してください。

次の手順を用いて、HiSeq 2500 SystemでTruSight Tumor 170のシーケンスを行うときのクラスター密度を最適化します。

- ▶ ランあたり12ライブラリー（6DNAおよび6RNA）をシーケンスして、各サンプルのカバレッジを最大化します。
- ▶ DNAライブラリーのみをシーケンスする場合は、6サンプル以下にします。

- ▶ RNAライブラリーのみをシーケンスする場合は、12サンプル以下にします。
- ▶ (オプション) アライメントとエラー率の計算用のポジティブコントロールとして低濃度のPhiX Controlスライクインを添加します。詳しくは、イルミナウェブサイトのPhiX Control v3サポートページを参照してください。
- ▶ DNAとRNAのライブラリー以外の組み合わせをシーケンスする場合、イルミナテクニカルサポートに連絡してください。

## 消耗品

- ▶ ノーマライズされたライブラリー (NLプレート)
- ▶ NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (300サイクル)
- ▶ HT1 (Hybridization Buffer)
- ▶ HiSeq Systemで用いるHiSeq試薬
  - ▶ HiSeq Rapid SBS Kit v2
  - ▶ HiSeq Rapid Cluster Kit v2 Paired-End and Single-Read
- ▶ 遠心チューブ (通常のスナップタイプと、スクリュウキャップタイプ)
- ▶ PhiX Control v3

## 事前準備

- 1 お使いのイルミナシーケンスプラットフォームに応じて、次の消耗品オプションのうちの1つを選んでください。
  - ▶ (オプション1) NextSeq Systemラン用に次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
NextSeq High-Output Reagent Cartridge (300サイクル)	-25°C~-15°C	室温の水槽の中で融解します (約60分間)。
HT1 (Hybridization Buffer)	-25°C~-15°C	室温で融解します。ボルテックスして懸濁します。
NextSeq Buffer Cartridge	15°C~30°C	室温で静置します。
NextSeq High-Output Flow cell	2°C~8°C	フローセルパッケージを開封します。30分間室温で静置します。

- ▶ (オプション2) HiSeq 2500 Systemラン用に次の消耗品を準備してください。

アイテム	保管条件	手順
HiSeq Rapid SBS Kit v2	-25°C~-15°C	室温で融解します。
HT1 (Hybridization Buffer)	-25°C~-15°C	室温で融解します。ボルテックスして懸濁します。
HiSeq Rapid Cluster Kit v2 Paired-End and Single Read	15°C~30°C	室温で静置します。
Grafted HiSeq Rapid PE Flow Cell v2	2°C~8°C	30分間静置し室温に戻します。

- 2 NLプレートが-25°C~-15°Cで保管されていた場合は、室温で融解し遠心してください。
- 3 ヒートブロックを96°Cに予熱します。
- 4 スクリューキャップタイプの遠心チューブにPRL (Pooled RNA Libraries) のラベルを貼ります。
- 5 スクリューキャップタイプの遠心チューブにPDL (Pooled DNA Libraries) のラベルを貼ります。
- 6 スクリューキャップタイプの遠心チューブにDIL1 (Dilution 1) のラベルを貼ります。
- 7 通常のスナップキャップの遠心チューブにDIL2 (Dilution 2) のラベルを貼ります。

## 手順

### ライブラリーのプール

- 1 ノーマライズされたRNAライブラリーをそれぞれ、NLプレートから1本のPRLチューブに10 $\mu$ Lずつ移送します。
- 2 ノーマライズされたDNAライブラリーをそれぞれ、NLプレートから1本のPDLチューブに10 $\mu$ Lずつ移送します。
- 3 ボルテックスして各チューブを混合します。
- 4 各チューブを短時間遠心します。
- 5 ヒートブロックを使用して、96°Cで2分間インキュベートします。
- 6 各チューブを2回転倒混和します。
- 7 短時間遠心した後、氷の上に5分間置きます。



#### ヒント

PRLおよびPDLのチューブは、-25°C~-15°Cで最長30日間保管できます。凍結保管されたPRLおよびPDLのチューブを用いる場合、ステップ5~7を繰り返して、チューブを再変性、混合、および冷却してから、33ページの「希釈の準備（初回）」に進みます。

### 希釈の準備（初回）

DNAおよびRNAライブラリーを同数シーケンスする場合は、DNA対RNAの比率を4：1でプールしてください。同数でないライブラリー同士（例：7DNA+3RNA）をシーケンスする場合は、イルミナテクニカルサポートに連絡してください。

シーケンス対象のライブラリータイプに応じた、次のプーリング手順のうちの1つを選択してください。

#### ▶ cDNAライブラリーとDNAライブラリーを同時にシーケンスするには：

- 1 空のDIL1チューブにPDLを20 $\mu$ L移送します。
- 2 5 $\mu$ LのPRLをDIL1に添加します。
- 3 475 $\mu$ LのHT1バッファーをDIL1に添加して1：20の希釈液を調製します。
- 4 ボルテックスして混合します。
- 5 短時間遠心します。
- 6 34ページの「NextSeqのためのライブラリーの希釈」または34ページの「HiSeqのためのライブラリーの希釈」に進みます。

#### ▶ DNAライブラリーのみをシーケンスするには：

- 1 空のDIL1チューブにPDLを10 $\mu$ L移送します。
- 2 190 $\mu$ LのHT1バッファーをDIL1に添加して1：20の希釈液を調製します。
- 3 ボルテックスして混合します。
- 4 短時間遠心します。

- 5 34ページの「NextSeqのためのライブラリーの希釈」または34ページの「HiSeqのためのライブラリーの希釈」に進みます。
- ▶ cDNAライブラリーのみをシーケンスするには：
  - 1 空のDIL1チューブにPRLを10 $\mu$ L移送します。
  - 2 190 $\mu$ LのHT1バッファーをDIL1チューブに添加して1：20の希釈液を調製します。
  - 3 ボルテックスして混合します。
  - 4 短時間遠心します。
  - 5 34ページの「NextSeqのためのライブラリーの希釈」または34ページの「HiSeqのためのライブラリーの希釈」に進みます。

## 希釈の準備（2回目）

ご使用中のシーケンスシステムに応じた適切な希釈プロトコールに従ってください。

### NextSeqのためのライブラリーの希釈

以下の手順を用いて、NextSeq System用のサンプルライブラリーを調製します。

- 1 空のDIL2チューブにDIL1を40 $\mu$ L移送します。
- 2 DIL2に1,360 $\mu$ LのHT1バッファーを添加します。
- 3 （オプション）変性された20 pMのPhiXを2.5 $\mu$ L添加します。
- 4 ボルテックスして混合します。
- 5 短時間遠心します。
- 6 1,300 $\mu$ LのDIL2を、『NextSeq 500 System Guide』（文書番号：15046563）または『NextSeq 550 System Guide』（文書番号：15069765）に記載のとおり、融解したNextSeq System試薬カートリッジにロードします。

### HiSeqのためのライブラリーの希釈

以下の手順を用いて、HiSeq System用のサンプルライブラリーを調製します。

- 1 空のDIL2チューブにDIL1を130 $\mu$ L移送します。
- 2 DIL2に1,170 $\mu$ LのHT1バッファーを添加します。
- 3 （オプション）変性された20 pMのPhiXを2.5 $\mu$ L添加します。
- 4 ボルテックスして混合します。
- 5 短時間遠心します。
- 6 HiSeq 2500 SystemのテンプレートローディングステーションにDIL2チューブの全量をロードします。試薬調製などの手順については、『HiSeq 2500 System Guide』（文書番号：15035786）を参照してください。

# サポート情報

はじめに .....	35
略語 .....	35
キット内容 .....	36
消耗品および機器 .....	38

## はじめに

本ガイドに記述したプロトコールでは、お客様がこの付録の内容に目を通し、キットの内容を確認し、必要な消耗品および機器をすべて入手していることを前提としています。

## 略語

略語	定義
1stSS	1st Strand Synthesis
2ndSS	2nd Strand Synthesis
ALS	Amplified Library Samples
cDNA	Complementary DNA
CF	cDNA Fragments
DIL1	Dilution 1
DIL2	Dilution 2
ELU1	Elution 1
ELU2	Elution 2
gDNA	Genomic DNA
HQ-RNA	High-quality RNA
HYB1	Hybridization 1
LQ-RNA	Low-quality RNA
LS	Library Samples
LP	Library Preparation
LP2	Library Preparation 2
NL	Normalized Libraries
PCF	Purified cDNA Fragments
PDL	Pooled DNA Libraries
PL	Purified Libraries
PNL	Pooled Normalized Libraries
PRL	Pooled RNA Libraries

## キット内容

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

### 注意

- ▶ Box1、8および9内の試薬のキャップは関連するライブラリーが特定できるよう、色分けされています。
  - ▶ 青色キャップは、DNAライブラリーとのみ用いられる試薬を示します。
  - ▶ 赤色キャップは、RNAライブラリーとのみ用いられる試薬を示します。

消耗品	カタログ番号
TruSight Tumor 170 NextSeq Kit (24 Sample Library Prep Kit、3 NextSeq 500/550 High Output v2 kits [300サイクル])	OP-101-1003
TruSight Tumor 170 (1ライブラリー調製、24サンプル)	OP-101-1004

## ライブラリー調製

### Box 1 - ライブラリー調製 - RNA (増幅前)

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	FSM	First Strand Synthesis Mix	-25°C~-15°C
1	SSM	Second Strand Mix	-25°C~-15°C
1	EPH3	Elute, Prime, Fragment High Mix 3	-25°C~-15°C
1	RVT	Reverse Transcriptase	-25°C~-15°C

### Box 2 - ライブラリー調製 - DNA (増幅前)

数量	試薬	内容説明	保存温度
2	ERA1-A	End Repair A-tailing Enzyme Mix 1	-25°C~-15°C
2	ERA1-B	End Repair A-tailing Buffer 1	-25°C~-15°C
2	ALB1	Adapter Ligation Buffer 1	-25°C~-15°C
2	LIG3	DNA Ligase 3	-25°C~-15°C
2	SUA1	Short Universal Adapters 1	-25°C~-15°C
2	STL	Stop Ligation Buffer	-25°C~-15°C
2	EPM	Enhanced PCR Mix	-25°C~-15°C

### Box 3 - ライブラリー調製 (増幅前)

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	RSB	Resuspension Buffer	2°C~8°Cまたは -25°C~-15°C
2	SPB	Sample Purification Beads	2°C~8°C
1	TEB	TE Buffer	2°C~8°C



## Box 4 - ライブラリー調製 - Unique PCR Index Primer Mixes (増幅前)

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	UP01	Unique Index Primer Mix 01	-25°C~-15°C
1	UP02	Unique Index Primer Mix 02	-25°C~-15°C
1	UP03	Unique Index Primer Mix 03	-25°C~-15°C
1	UP04	Unique Index Primer Mix 04	-25°C~-15°C
1	UP05	Unique Index Primer Mix 05	-25°C~-15°C
1	UP06	Unique Index Primer Mix 06	-25°C~-15°C
1	UP07	Unique Index Primer Mix 07	-25°C~-15°C
1	UP08	Unique Index Primer Mix 08	-25°C~-15°C
1	UP09	Unique Index Primer Mix 09	-25°C~-15°C
1	UP10	Unique Index Primer Mix 10	-25°C~-15°C
1	UP11	Unique Index Primer Mix 11	-25°C~-15°C
1	UP12	Unique Index Primer Mix 12	-25°C~-15°C
1	UP13	Unique Index Primer Mix 13	-25°C~-15°C
1	UP14	Unique Index Primer Mix 14	-25°C~-15°C
1	UP15	Unique Index Primer Mix 15	-25°C~-15°C
1	UP16	Unique Index Primer Mix 16	-25°C~-15°C

## Box 5 - ライブラリー調製 - Combinatorial PCR Index Primer Mixes (増幅前)

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	CP01	Combinatorial Index Primer Mix 01	-25°C~-15°C
1	CP02	Combinatorial Index Primer Mix 02	-25°C~-15°C
1	CP03	Combinatorial Index Primer Mix 03	-25°C~-15°C
1	CP04	Combinatorial Index Primer Mix 04	-25°C~-15°C
1	CP05	Combinatorial Index Primer Mix 05	-25°C~-15°C
1	CP06	Combinatorial Index Primer Mix 06	-25°C~-15°C
1	CP07	Combinatorial Index Primer Mix 07	-25°C~-15°C
1	CP08	Combinatorial Index Primer Mix 08	-25°C~-15°C
1	CP09	Combinatorial Index Primer Mix 09	-25°C~-15°C
1	CP010	Combinatorial Index Primer Mix 10	-25°C~-15°C
1	CP011	Combinatorial Index Primer Mix 11	-25°C~-15°C
1	CP012	Combinatorial Index Primer Mix 12	-25°C~-15°C
1	CP013	Combinatorial Index Primer Mix 13	-25°C~-15°C
1	CP014	Combinatorial Index Primer Mix 14	-25°C~-15°C
1	CP015	Combinatorial Index Primer Mix 15	-25°C~-15°C
1	CP016	Combinatorial Index Primer Mix 16	-25°C~-15°C

## 濃縮

## Box 6 - 濃縮（増幅後）

数量	試薬	内容説明	保存温度
2	TCB1	Target Capture Buffer 1	2°C～8°C
2	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	2°C～8°C
2	HP3	2N NaOH	2°C～8°C
2	ET2	Elution Target 2	2°C～8°C
2	LNB1	Library Normalization Beads 1	2°C～8°C
2	LNW1	Library Normalization Wash 1	2°C～8°C
1	RSB	Resuspension Buffer	2°C～8°C または-25°C～-15°C
2	SPB	Sample Purification Beads	2°C～8°C
2	LNS2	Library Normalization Storage 2	15°C～30°C

▶ 2°C～8°CのボックスからLNS2チューブを取り外し、受け取り次第、15°C～30°Cで保管してください。

## Box 7 - 濃縮（増幅後）

数量	試薬	内容説明	保存温度
2	TCA1	Target Capture Additives 1	-25°C～-15°C
4	EEW2	Enhanced Enrichment Wash 2	-25°C～-15°C
2	EE2	Enrichment Elution 2	-25°C～-15°C
2	EPM	Enhanced PCR Mix	-25°C～-15°C
2	PPC3	PCR Primer Cocktail 3	-25°C～-15°C
2	LNA1	Library Normalization Additives 1	-25°C～-15°C

## Box 8 - TruSight Tumor 170 Content Set（DNAのみ）

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	OPD1	Oncology DNA Probes Master Pool	-25°C～-15°C

## Box 9 - TruSight Tumor 170 Content Set（RNAのみ）

数量	試薬	内容説明	保存温度
1	OPR1	Oncology RNA Probes Master Pool	-25°C～-15°C

## 消耗品および機器

プロトコルを開始する前に必要なユーザーが用意する消耗品および機器が揃っていることを確認してください。

プロトコルは、一覧に挙げたアイテムを用いて最適化および検証されています。別の消耗品および機器を使用する場合、同等の性能は保証されません。

## 消耗品

消耗品	サプライヤー
(オプション) AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 1 DNA Standard	Biotium、カタログ番号：31029
(オプション) AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN、カタログ番号：80234
(オプション) QuantiFluor RNA System	Promega、カタログ番号：E3310
(オプション) Agilent DNA 1000 Kit	Agilent、カタログ番号：5067-1504
(オプション) Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent、カタログ番号：5067-1511
(オプション) Standard Sensitivity RNA Analysis Kit	Advanced Analytical Technologies、 カタログ番号：DNF-471-0500
(オプション) FFPE QC Kit	イルミナ、カタログ番号：WG-321-1001
(オプション) DNA Reference Standard	Horizon Diagnostics、カタログ番号：HD753
(オプション) Universal Human Reference RNA	Agilent、カタログ番号：740000
8 microTUBE Strip	Covaris、パーツ番号 520053
Rack E220evolution 8 microTUBE Strip adapter (E220evolution用)	Covaris、パーツ番号 500430
Rack 12 place 8 microTUBE Strip adapter (LE220用)	Covaris、パーツ番号 500191
1.7 mL遠心チューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
2 mL遠心チューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
15 mLコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
50 mLコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µLフィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLフィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1 mLフィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
96ウェル保存用プレート、0.8 mL (MIDIプレート)	Fisher Scientific、パーツ番号 AB-0859
96ウェルPCRプレート、0.2 mL (ポリプロピレン)	一般的なラボ用品サプライヤー
96ウェルマイクロプレート、黒、透明平底	Corning、パーツ番号 3904
ヌクレアーゼフリー試薬リザーバー (PVC、再使用禁止トラフ)	VWR、パーツ番号 89094-658
Microseal 'B'粘着シール (粘着プレートシール)	Bio-Rad、パーツ番号 MSB-1001
PCRグレード水	一般的なラボ用品サプライヤー
エタノール (200プルーフ、分子生物学用)	Sigma-Aldrich、パーツ番号 E7023
HiSeq Rapid SBS Kit v2 (200サイクル)	イルミナ、カタログ番号：FC-402-4021
HiSeq Rapid Cluster Kit v2- Paired-End and Single-Read	イルミナ、カタログ番号：GD-402-4002
NextSeq 500/550 High-Output Kit v2 (300サイクル)	イルミナ、カタログ番号：FC-404-2004

## 装置（増幅前）

機器	サプライヤー
サーマルサイクラー	一般的なラボ用品サプライヤー
ヒートブロック（1.5 mL遠心チューブ）	一般的なラボ用品サプライヤー
ヒートブロック（Hybexインキュベーター、ヒーティングベース） （2個）	SciGene、カタログ番号： • 1057-30-O（115V） または • 1057-30-2（230V）
MIDIヒートブロックインサート（Hybex用）（2個）	イルミナ、カタログ番号：BD-60-601
テーブルトップ遠心機（プレート遠心機）	一般的なラボ用品サプライヤー
遠心機（1.5 mLチューブ）	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド-96	Thermo Fisher、カタログ番号：AM10027
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
プレートシェーカー（BioShake XP）	Q Instruments、パーツ番号 1808-0505
Covaris Focused-ultrasonicator	• Covaris、パーツ番号 500219（モデルLE220） あるいは • Covaris、パーツ番号 500429（モデルE220evolution）
（オプション）2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent、パーツ番号：G2940CA
（オプション）Fragment Analyzer Automated CE System	Advanced Analytical Technologies、 パーツ番号：FSv2-CE2またはFSv2-CE10

## 装置（増幅後）

機器	サプライヤー
ヒートブロック（1.5 mL遠心チューブ）	一般的なラボ用品サプライヤー
ヒートブロック（Hybexインキュベーター、96ウェルプレート）	SciGene、カタログ番号： • 1057-30-O（115V） または • 1057-30-2（230V）
MIDIヒートブロックインサート（Hybex用）	イルミナ、カタログ番号：BD-60-601
テーブルトップ遠心機（プレート遠心機）	一般的なラボ用品サプライヤー
遠心機（1.5 mLチューブ）	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド-96	Thermo Fisher、カタログ番号：AM10027
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
プレートシェーカー（BioShake XP）	Q Instruments、パーツ番号 1808-0505
サーマルサイクラー	一般的なラボ用品サプライヤー
NextSeq System	イルミナ、カタログ番号： • SY-415-1001 または • SY-415-1002
（オプション）2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent、パーツ番号：G2940CA
（オプション）Fragment Analyzer Automated CE System	Advanced Analytical Technologies、 パーツ番号：FSv2-CE2またはFSv2-CE10
（オプション）HiSeq System	イルミナ、カタログ番号：SY-401-2501

# テクニカルサポート

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

ウェブサイト：[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)  
電子メール：[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	リージョナル
北米	+1.800.809.4566	
オーストラリア	+1.800.775.688	
オーストリア	+43 800006249	+43 19286540
ベルギー	+32 80077160	+32 34002973
中国	400.635.9898	
デンマーク	+45 80820183	+45 89871156
フィンランド	+358 800918363	+358 974790110
フランス	+33 805102193	+33 170770446
ドイツ	+49 8001014940	+49 8938035677
香港	800960230	
アイルランド	+353 1800936608	+353 016950506
イタリア	+39 800985513	+39 236003759
日本	0800.111.5011	
オランダ	+31 8000222493	+31 207132960
ニュージーランド	0800.451.650	
ノルウェー	+47 800 16836	+47 21939693
シンガポール	+1.800.579.2745	
スペイン	+34 911899417	+34 800300143
スウェーデン	+46 850619671	+46 200883979
スイス	+41 565800000	+41 800200442
台湾	00806651752	
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
その他の国	+44.1799.534000	

**製品安全データシート (SDS)**：イルミナのウェブサイト[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**：イルミナのウェブサイトからPDF形式でダウンロードできます。[jp.support.illumina.com](http://jp.support.illumina.com)にアクセスして製品を選び、**[Documentation & Literature]** を選択します。



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](http://jp.illumina.com)

研究目的での使用に限定されます。診断での使用はできません。

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®