

illumina®

# Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号 : 1000000124518 v03 JPN

2022年6月

**本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。**

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説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

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

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

商標はすべて、Illumina, Inc. または各所有者の所有物です。商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](https://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。

# 改訂履歴

文書	日付	変更内容
文書番号： 1000000124518 v03	2022 年 6 月	<p>追加</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>アンカーのライゲーションに関する一般的な用語</li> <li>1 サイクル目のダークサイクルを含む NextSeq 2000 カスタムレシピ</li> <li>試薬の取り扱いにおけるサンプルの複数回使用に関するガイダンス</li> </ul> <p>更新</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>16 Samples キットの構成</li> <li>アンカープレートの色についての記載</li> <li>タイトルに「Ligation」を追加</li> <li>「消耗品および機器」に、NextSeq 2000 ユーザー向けに KAPA qPCR Library Quantification Kit と qPCR 装置を追加</li> <li>Bioanalyzer によるトレースに関して、使用する抽出手法の実行中に DNase 処理を実施する必要がある旨とダイマーのピークを追加</li> <li>消耗品をアルファベット順に整理</li> <li>スタイルガイドに合わせて全体の表現と書式を変更</li> <li>「ライブラリーのチェック」ステップを更新して明確化</li> </ul>
文書番号： 1000000124518 v02	2021 年 4 月	NextSeq 1000/2000 システムの希釈と定量に関する情報を追加。Agencourt RNAClean XP Beads を削除。EPH3 および FSA の定義を修正。
文書番号： 1000000124518 v01	2020 年 8 月	ワークフローの図を更新し、処理時間の算出に用いるサンプル数を追加。インデックスのキット名の形式を修正。
文書番号： 1000000124518 v00	2020 年 6 月	初版

# 目次

改訂履歴 .....	iii
<b>概要 .....</b>	<b>1</b>
RNA インプット量に関する推奨事項 .....	1
追加リソース.....	2
<b>プロトコール .....</b>	<b>3</b>
はじめに .....	3
プーリングの準備 .....	3
ビーズの取り扱い .....	3
ヒントおよびテクニック .....	4
ライブラリー調製のフロー図.....	5
mRNA の精製と断片化 .....	6
事前準備.....	6
手順 .....	7
1st strand cDNA の合成 .....	9
事前準備.....	10
手順 .....	10
2nd strand cDNA の合成.....	11
事前準備.....	11
手順 .....	12
3' 末端のアデニン付加.....	13
事前準備.....	13
手順 .....	14
アンカーのライゲーション .....	14
事前準備.....	15
手順 .....	15
断片のクリーンアップ.....	16
手順 .....	16
ライブラリーの増幅.....	17
事前準備.....	18
手順 .....	18
ライブラリーのクリーンアップ .....	19
事前準備.....	19
手順 .....	19

ライブラリーのチェック .....	20
ライブラリーの開始濃度への希釈 .....	22
T- オーバーハングのトリミング (オプション) .....	23
<b>付録 A サポート情報 .....</b>	<b>24</b>
はじめに .....	24
略語 .....	24
キットの内容と保管条件 .....	25
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples) (20040532) .....	26
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Samples) (20040534) .....	27
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040553) .....	28
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040554) .....	28
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (2004555) .....	28
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040556) .....	28
消耗品および機器 .....	29
消耗品 .....	29
機器 .....	30
<b>テクニカルサポート .....</b>	<b>31</b>

# 概要

Illumina® Stranded mRNA Prep, Ligation キットは、トータル RNA 中のメッセンジャー RNA (mRNA) を最大 384 のデュアルインデックスライブラリーに変換します。

polyA テールを持つ mRNA 分子をオリゴ (dT) 磁気ビーズにより精製しキャプチャーします。精製された mRNA は断片化され、逆転写酵素とランダムプライマーを用いて 1st strand 相補的 DNA (cDNA) にコピーされます。2nd strand cDNA 合成ステップで、dUTP が dTTP に代わり、鎖特異性を獲得します。終盤のステップで、断片末端にアデニン (A) 塩基とチミン (T) 塩基が付加され、アダプターが付加されます。最終生成物は精製され、選択的に増幅されて、イルミナのシステムでシーケンスが行えるようになります。

本キットには次のような特徴があります。

- mRNA を選択的にシーケンスするための polyA キャプチャー
- ポリアデニル化されたコーディング RNA とさまざまな形態のノンコーディング RNA のキャプチャー
- IDT for Illumina RNA UD Indexes を用いてのユニークデュアル (UD) インデックスの付与

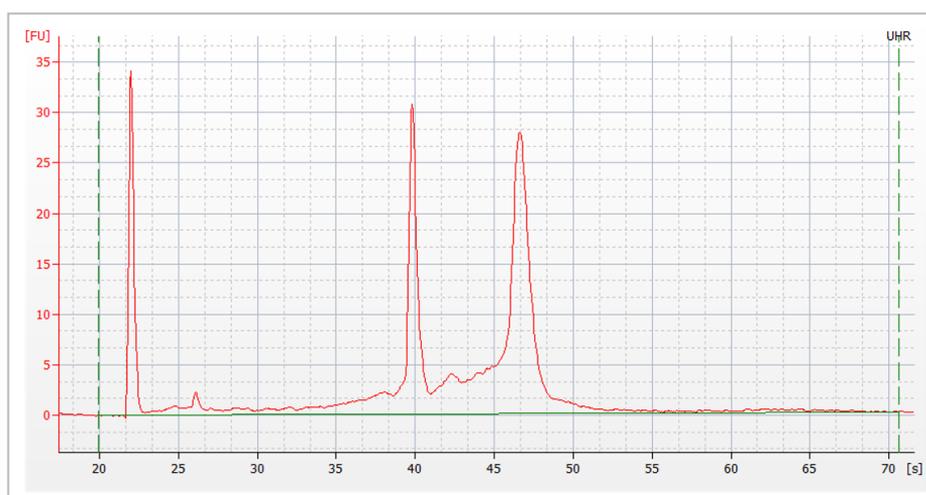
## RNA インプット量に関する推奨事項

本製品のプロトコールは、ヒトサンプル由来の 25 ~ 1000 ng の高品質トータル RNA 向けに最適化されています。これよりも少ないインプット量では、ライゲーションに影響が生じ、収量が減少する可能性があります。その他の種や品質レベルの場合のインプット量を特定するには、さらなる最適化が必要です。

RNA 抽出の手法には DNase 処理も含めてください。DNase 処理は、使用する抽出手法の実行中に実施する必要があります。DNase 処理により、サンプル純度と定量の精度を確かなものにします。本プロトコールを開始する前に、標準的な手法を用いてトータル RNA を定量し、フラグメント解析法により品質を評価します。

下の図は、Universal Human Reference (UHR) トータル RNA をインプットした場合のトレースの例です。トレースには、2100 Bioanalyzer System と RNA 6000 Pico Kit を使用しました。

図 1 UHR をインプットした場合のトレースの例



# 追加リソース

以下のリソースには、Illumina Stranded mRNA キットを使用してライブラリーを調製するための手順とガイドラインが記載されています。詳細については、Illumina Stranded mRNA のサポートページをご覧ください。

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

リソース	説明
<a href="#">Custom Protocol Selector</a>	ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、および解析手法まで各ユーザーに合った手順を生成するためのツールです。詳細まで調整できるオプションがあります。
『Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Checklist』 (文書番号 : 1000000124519)	実験される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 Stranded mRNA Prep, Ligation Consumables & Equipment』 (文書番号 : 1000000124520)	ユーザー側で用意する消耗品および機器について確認できるチェックリストが用意されています。
『Index Adapters Pooling Guide』 (文書番号 : 1000000041074)	バランスの取れたインデックスコンビネーションを使用して、イルミナのシステムでシーケンスするためのデュアルインデックスライブラリーを調製するためのガイドラインです。
『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号 : 1000000002694)	イルミナ製シーケンス製品に用いられているイルミナ製オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が用意されています。

# プロトコール

## はじめに

本章では、Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation のプロトコールの各ステップについて説明します。

- サンプルから解析に至るまでの完全なシーケンスワークフローを見直し、製品と実験パラメーターの互換性を確認してください。
- キットの中身を確認し、ライブラリー調製用試薬、インデックスアンカー、インデックスアダプターなど、必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。全項目の一覧表については、[24 ページの「サポート情報」](#)を参照してください。

## プーリングの準備

ライブラリーをプーリングする場合は、ライブラリー調製を開始する前にサンプルの情報を記録してください。お手持ちのシーケンスシステムおよびライブラリーと互換性のある記録ツールを使用してください。互換性については、Illumina Stranded mRNA のサポートページか、使用するシステムのサポートページをご覧ください。

本プロトコールでは、IDT for Illumina RNA UD Indexes を使用して、最初にアンカーを付加し、次に UD インデックスを付加する 2 つの別のステップでライブラリーにインデックスを付けます。UD インデックスプライマーにより、インデックス 1 (i7) の配列とインデックス 2 (i5) の配列が、断片の各末端に付加されます。インデックスシーケンスの長さはいずれも 10 bp です。

- プレックス数の少ない、カラーバランスの取れたプールを作成する方法については、『[Index Adapters Pooling Guide](#)』（文書番号：1000000041074）を参照してください。
- インデックスアダプターの配列とその記録方法については、『[Illumina Adapter Sequences](#)』（文書番号：1000000002694）を参照してください。

## ビーズの取り扱い

本プロトコールでは、RNA Purification Beads と Agencourt AMPure XP を使用します。これらのビーズには、それぞれ特有の技術が応用されているため、他のもので代用することはできません。

ビーズを取り扱う際は、以下の方法で行ってください。

- ビーズは室温で使用してください。
- 2°C未満で保管されていたビーズは**使用しないでください**。
- ビーズは、毎回の使用前と、プロトコールの全体にわたって頻繁にボルテックスし、懸濁してください。懸濁後のビーズは、均一に分散しており、色が均一になっています。
- 液体をビーズペレットに直接分注し、ウェル側面のビーズにも液体がかかるようにしてください。
- プレートが磁気スタンドに載せている間は、プレートを激しく攪拌したり、ビーズペレットを動かしたりしないでください。
- ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻してから、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ちます。
- ビーズがウェルの側面に付着した場合は、280 × g で 3 秒間遠心し、その後、分注して懸濁します。

# ヒントおよびテクニック

## プロトコールを途中で中断しない

- 指定のパラメーターを用いて、記載順にプロトコールを実行してください。
- RNA が二本鎖 cDNA に変換されるまでは、操作を長時間中断しないでください。
- プロトコールにセーフストップポイントが指定されていない限り、直ちに次の手順に進んでください。

## クロスコンタミネーションの防止

- サンプルを添加または移す場合は、**サンプルごとにチップ**を交換してください。
- アダプターまたはプライマーを添加する場合は、**ウェルごとにチップ**を交換してください。
- 使用しないインデックスアダプタープレートは作業台から取り除いてください。

## 試薬および RNA の取り扱い

- インプット RNA を複数回凍結／融解しないでください。
  - RNA は、RNase フリー水または TE バッファーに入れた状態で、 $-85^{\circ}\text{C}$ ～ $-65^{\circ}\text{C}$ で最長 1 年間保存可能です。
  - 同じサンプルを複数回使用する必要がある場合、1 回分ずつ  $7.5\ \mu\text{L}$  以下をチューブに分注してください。
- 融解した試薬は必要時まで氷上に置いておいてください。試薬はすべて、使用后、保管場所に正しく戻してください。
- 使わないときは、プレートにシールし、試薬のキャップを閉めて、コンタミネーションを防いでください。

## プレートのシール

- プロトコール全体にわたって、Microseal 'B' シーリングフィルムを使用してください。このシールは  $-40^{\circ}\text{C}$ ～ $110^{\circ}\text{C}$ で有効です。
- このシールでプレートを覆い、ゴム製ローラーまたはゴム製ウェッジでシールしてください。
- プレートから取り外したシールは、毎回廃棄してください。

## プレート間の移動

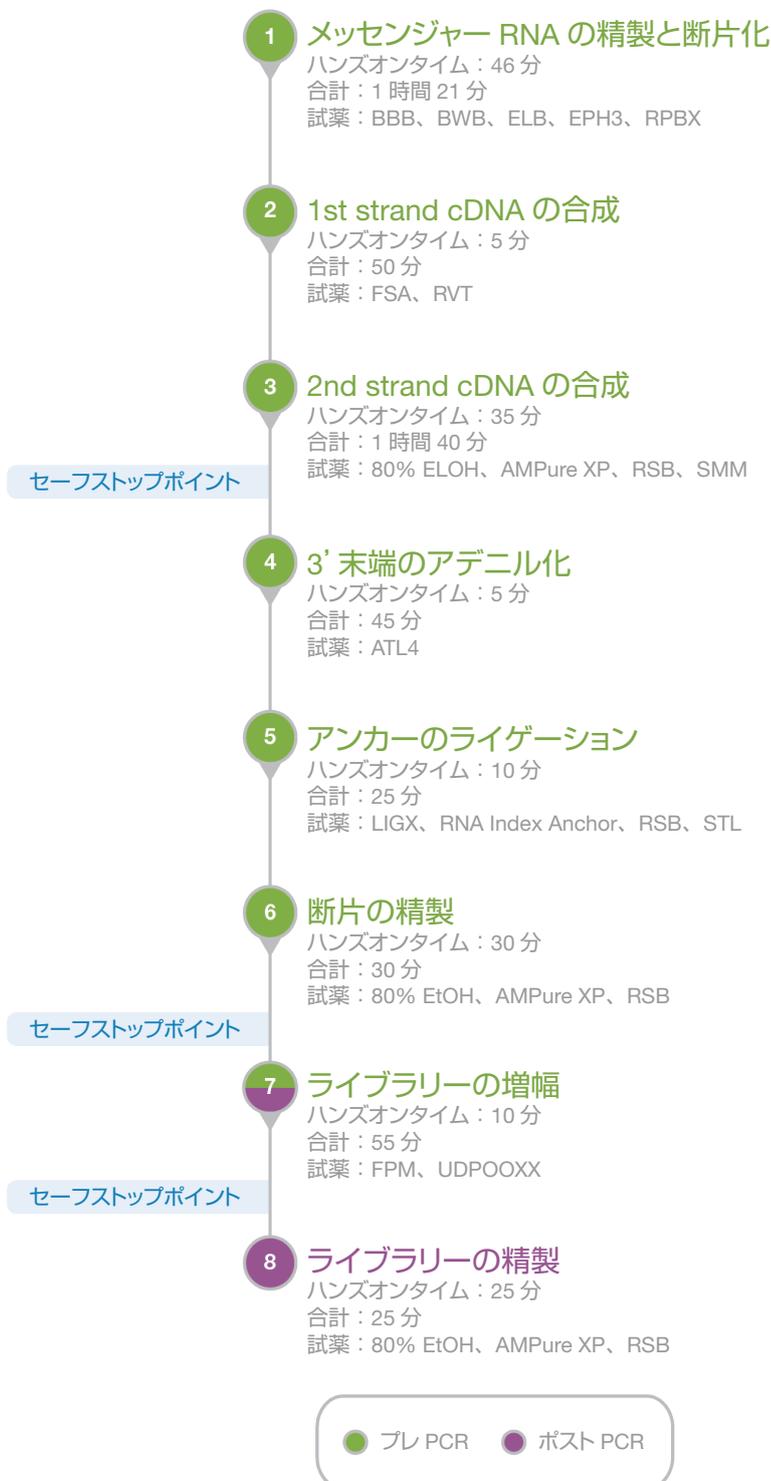
- 溶液をプレートから別のプレートに移す場合は、プレートの各ウェルから特定の分量を取り、別のプレートの対応するウェルに移してください。

## 混合と遠心

- 本プロトコールでは、攪拌による混合か、ピペッティングによる混合のいずれかを選択することができます。次のように、それぞれの混合方法に適した磁気スタンドを使用してください。
  - ピペッティングによる混合を選択した場合は、Magnetic Stand-96 を使用してください。
  - 攪拌による混合を選択した場合は、DynaMag-96 Side Magnet を使用してください。
- 各ステップにおいて、 $280 \times g$  で 10 秒間遠心することで、ウェルの底に溜まっている液体やビーズを均一にしてサンプルロスを防ぎます。

# ライブラリー調製のフロー図

下の図に、24 サンプルを用いた場合の Illumina Stranded mRNA のプロトコルの概要を示します。ステップとステップの間にセーフストップポイントがあります。



# mRNA の精製と断片化

このステップでは、オリゴ (dT) 磁気ビーズを用いて、polyA-tail を持つメッセンジャー RNA (mRNAs) をキャプチャーします。キャプチャーされた RNA は断片化され、プライミングにより cDNA 合成を促します。

## 消耗品

- BBB (Bead Binding Buffer)
- BWB (Bead Washing Buffer)
- ELB (Elution Buffer)
- EPH3 (Elute, Prime, Fragment 3HC Mix)
- RPBX (RNA Purification Beads)
- ヌクレアーゼフリー超純水
- 1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き) (2)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
  - FSA (First Strand Synthesis Mix)

## 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	説明
BBB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
BWB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
ELB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
EPH3	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
FSA	-25°C ~ -15°C	氷上で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
RPBX	2°C ~ 8°C	10分間静置し、室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

2. 以下の mRNA\_CAP 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
- 反応ボリューム 50 µL
- 65°C 5 分
- 4°C 30 秒
- 23°C 5 分
- 23°C ホールド

3. 以下の mRNA\_ELT 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
  - 反応ボリューム 25  $\mu$ L
  - 80°C 2分
  - 25°C ホールド
4. サーマルサイクラーに次の DEN94\_8 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
  - 反応ボリューム 19  $\mu$ L
  - 94°C 8分
  - 4°C ホールド

## 手順

### mRNA のキャプチャー

1. 新しい PCR プレートの各ウェル内で、25 ~ 1000 ng のトータル RNA をヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、25  $\mu$ L になるようにします。
2. RPBX をボルテックスして懸濁します。
3. 各ウェルに RPBX を 25  $\mu$ L 添加します。
4. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
  - ピペッティングを 10 回行い、その後シールします。
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、mRNA\_CAP プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 15 分程で、各ウェルの液量は 50  $\mu$ L です。

### mRNA の溶出

1. シールした PCR プレートを 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
2. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
3. 上清をすべて除去し、廃棄します。
4. プレートを磁気スタンドから下ろします。

5. 各ウェルに BWB を 100  $\mu$ L 添加します。
6. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
  - ピペッティングを 10 回行います。
7. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
8. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. 20  $\mu$ L ピペットで、残存 BWB をすべて除去します。
10. プレートを磁気スタンドから下ろします。
11. 各ウェルに ELB を 25  $\mu$ L 添加します。
12. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後シールします。
13. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後シールします。
14. 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
15. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、mRNA\_ELT プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 6 分程で、各ウェルの液量は 25  $\mu$ L です。

## mRNA のクリーンアップ

1. 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、Fragmentation Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
  - ヌクレアーゼフリー超純水 (10.5  $\mu$ L)
  - EPH3 (10.5  $\mu$ L)正確にピペッ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. シールした PCR プレートを 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
3. 各ウェルに BBB を 25  $\mu$ L 添加します。
4. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
  - ピペッティングを 10 回行います。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
7. 上清を 50  $\mu$ L 取り除き、廃棄します。
8. プレートを磁気スタンドから下ろします。
9. 各ウェルに BWB を 100  $\mu$ L 添加します。
10. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
  - ピペッティングを 10 回行います。

11. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
12. 上清をすべて除去し、廃棄します。
13. 20  $\mu$ L ピペットで、残存 BWB をすべて除去します。
14. プレートを磁気スタンドから下ろします。
15. Fragmentation Master Mix をしっかりピペッティングして混合します。
16. 各ウェルに Fragmentation Master Mix を 19  $\mu$ L ずつ添加します。
17. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートをシールして 2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後シールします。
18. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後シールします。
19. 室温で 2 分間インキュベートします。
20. 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。

### mRNA の断片化と変性

1. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、DEN94\_8 プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 10 分程で、各ウェルの液量は 19  $\mu$ L です。
2. シールした PCR プレートを 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
3. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
4. 各ウェルから、上清を 17  $\mu$ L ずつ、新しい PCR プレートに移します。
5. 新しいほうの PCR プレートは氷上に置いておきます。

## 1st strand cDNA の合成

このステップでは、ヘキサマーでプライミングした RNA 断片を逆転写し、1st strand 相補的 DNA (cDNA) を生成します。First Strand Synthesis Mix はアクチノマイシン D を含有しています。アクチノマイシン D は、擬似的な DNA 依存的合成を防ぎ、RNA 依存的合成を可能にして鎖特異性を高めます。

### 消耗品

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

- !** 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、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。

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

2. サーマルサイクラーに次の FSS 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
- 反応ボリューム 25  $\mu$ L
- 25°C 10 分
- 42°C 15 分
- 70°C 15 分
- 4°C ホールド

## 手順

1. 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、First Strand Synthesis Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
  - FSA (9  $\mu$ L)
  - RVT (1  $\mu$ 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. First Strand Synthesis Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
3. シールした PCR プレート を 280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
4. 各ウェルに First Strand Synthesis Master Mix を 8  $\mu$ L ずつ添加します。
5. ピペティングを 10 回行い、その後シールします。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、FSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 43 分程で、各ウェルの液量は 25  $\mu$ L です。

# 2nd strand cDNA の合成

このプロセスでは、RNA テンプレートを除去し、代替鎖を合成して、末端が平滑化された二本鎖 cDNA 断片を生成します。デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) の代わりにデオキシウリジン三リン酸 (dUTP) を取り込ませることで増幅時に 2nd strand の合成反応を停止し、鎖特異性を獲得します。

## 消耗品

- RSB (Resuspension Buffer)
- SMM (Second Strand Marking Master Mix)
- Agencourt AMPure XP
- 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカーフ付き)
- Microseal 'B' シーリングフィルム

## 試薬について

- 80% EtOH は用時調製し、1 日経ったものは廃棄してください。本プロトコールには、用時調製 80% EtOH が必要となるクリーンアップステップが 3 つあります。

## 事前準備

1. 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。
2. サーマルサイクラーに次の SSS 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、40°C に設定
  - 反応ボリューム 50  $\mu$ L
  - 16°C 1 時間
  - 4°C ホールド (最長 16 時間)

# 手順

## cDNA の生成

1. シールした PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに SMM を 25 μL 添加します。
3. ピペッティングを 10 回行い、その後シールします。
4. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、SSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 1 時間程で、各ウェルの液量は 50 μL です。

## cDNA のクリーンアップ

1. シールした PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
3. 各ウェルに AMPure XP を 90 μL ずつ添加します。
4. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングします。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
7. 上清を 130 μL 取り除き、廃棄します。
8. 次の手順でビーズを洗浄します。
  - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL 添加します。
  - b. 30 秒間待ちます。
  - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. **2 回目**の洗浄を行います。
10. 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
11. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
12. プレートを磁気スタンドから下ろします。
13. 各ウェルに RSB を 19.5 μL 添加します。
14. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールし、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後シールします。

15. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。
16. 室温で2分間インキュベートします。
17. 280 × g で10秒間遠心します。
18. 磁気スタンドに載せ、2分間待ちます。
19. 各ウェルから、上清を17.5 µL ずつ、新しいPCRプレートに移します。  
少量のビーズのキャリーオーバーがあっても性能には影響ありません。

### セーフストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、-25°C～-15°Cで保存してください（最長7日間）。

## 3' 末端のアデニン付加

このステップでは、平滑断片の3'末端にアデニン（A）ヌクレオチドを付加し、アダプターライゲーション時に3'末端同士が結合しないようにします。アダプターの3'末端上の、対応するチミン（T）ヌクレオチドが相補的なオーバーハングとなり、アダプターが断片に結合します。

### 消耗品

- ATL4 (A-Tailing Mix)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
  - アンカープレート (RNA Index Anchor)
  - STL (Stop Ligation Buffer)

### 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	説明
アンカープレート	-25°C～-15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
ATL4	-25°C～-15°C	室温で融解します。軽くはじいて混合し、短時間遠心します。
STL	-25°C～-15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心します。

2. サーマルサイクラーに次の ATAIL 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
  - 反応ボリューム 30 µL
  - 37°C 30分
  - 70°C 5分
  - 4°C ホールド

## 手順

1. セーフストップポイントでの中断後にプロトコルを再開する場合は、シールした PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに ATL4 を 12.5 μL ずつ添加します。
3. 200 μL ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後シールします。
4. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、ATAIL プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 38 分程で、各ウェルの液量は 30 μL です。

## アンカーのライゲーション

このステップでは、プレインデックスアンカーを二本鎖 cDNA 断片の末端に付加することで、デュアルインデックスの付加に備えます。その後の PCR 増幅ステップで、インデックスアダプター配列を付加します。

### 消耗品

- LIGX (Ligation Mix)
- STL (Stop Ligation Buffer)
- RNA インデックスアンカープレート (RNA Index Anchor)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Microseal 'B' シーリングフィルム
- 後の手順のために用意しておくもの：
  - Agencourt AMPure XP

### 試薬について

- LIGX は、-25°C ~ -15°C で保存しても液体のままですので、融解は不要です。
- アンカープレートの各ウェルは使い切りで、RNA Index Anchor を含有します。アンカープレートの各ウェルの液量は同じで、順不同で使用できます。
- アンカープレートは、後のステップで使用するインデックスプレートとは異なります。プレートのラベルを確認し、プレートが間違っていないか確認してください。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備してください。

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

2. サーマルサイクラーに次の LIG プログラムを保存します。

- プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定
- 反応ボリューム 38 µL
- 30°C 10分
- 4°C ホールド

## 手順

### アンカーの付加

1. シールした PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 以下の分量を、以下の記載順に、各ウェルに添加します。RNA Index Anchor をアンカープレートから PCR プレートに移します。

添加順序	試薬	サンプルインプット量が 100 ng (µL) 以下の場合	サンプルインプット量が 100 ng (µL) を超える場合
1	RSB	2.5	0
2	RNA Index Anchor	2.5	5
3	LIGX	2.5	2.5

3. 200 µL ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後シールします。
4. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、LIG プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 13 分程で、各ウェルの液量は 38 µL です。

### ライゲーションの停止

1. シールした PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. 各ウェルに STL を 5 µL 添加します。
3. ピペッティングを 15 回行って混合します。  
各ウェルの液量は 43 µL です。

# 断片のクリーンアップ

このステップでは、磁気ビーズを用いて、アダプター結合後の断片を精製します。

## 消耗品

- RSB (Resuspension Buffer)
- Agencourt AMPure XP
- 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカーブ付き)
- Microseal 'B' シーリングフィルム

## 手順

1. AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
2. 各ウェルに AMPure XP を 34  $\mu$ L 添加します。
3. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
4. 室温で 5 分間インキュベートします。
5. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
6. 上清を 67  $\mu$ L 取り除き、廃棄します。
7. 次の手順でビーズを洗浄します。
  - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175  $\mu$ L 添加します。
  - b. 30 秒間待ちます。
  - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
8. **2回目**のビーズ洗浄を行います。
9. 20  $\mu$ L ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
10. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
11. プレートを磁気スタンドから下ろします。
12. 各ウェルに RSB を 22  $\mu$ L 添加します。
13. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。

14. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。
15. 室温で2分間インキュベートします。
16. 280 × g で10秒間遠心します。
17. 磁気スタンドに載せ、2分間待ちます。
18. 新しいPCRプレートの対応する各ウェルに、上清 20 µL を移します。増幅PCRサイクル数は、サンプルのインプット量によって異なります。複数のサンプルを調製する場合は、[17 ページの「ライブラリーの増幅」](#)の手順に記載されているPCRサイクル数に従って、別々のプレートに移してください。

### セーフストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、-25°C~-15°Cで保存してください（最長7日間）。

## ライブラリーの増幅

このステップでは、アンカーを結合させた DNA 断片を PCR により選択的に増幅し、インデックスと、クラスター形成のためのプライマー配列を付加します。その結果、デュアルインデックスライブラリー、すなわち両末端にアダプターが付加された DNA 断片が出来上がります。

インデックスアダプターの選択については、[3 ページの「プーリングの準備」](#)を参照してください。

### 消耗品

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- インデックスアダプタープレート (UDP0XXX)

### 試薬について

- インデックスアダプタープレートの各ウェルは使い切りで、UDP0XXX (10 µL 超) を含有します。UDP0XXX は、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターとインデックス 2 (i5) アダプターです。
- 行および列のラベルはインデックスアダプタープレートの底面に印刷されています。プレートを持ち上げてラベルを確認してください。

## 事前準備

1. 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EPM	-25℃～ -15℃	室温で融解します。転倒混和し、短時間遠心します。
インデックスアダプタープレート	-25℃～ -15℃	室温で融解します。ボルテックスして混合し、1000 × g で1分間遠心します。

2. 下の表に記載されている適切な PCR サイクル数を用いて、以下の PCR プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- プレヒートリッドオプションを選択し、100℃に設定
- 反応ボリューム 50 µL
- 98℃ 30 秒
- サイクル数 X:
  - 98℃ 10 秒
  - 60℃ 30 秒
  - 72℃ 30 秒
- 72℃ 5 分
- 4℃ホールド（最長 16 時間）

インプット量に応じてプログラムを最適化します。

複数のサンプルを 1 枚のプレートで増幅する場合は、それぞれのサンプルのインプット量が同じになるようにしてください。

インプット量 (ng)	PCR サイクル数 (X)
25	15
100	13
1000	10

プログラムの所要時間は、15 サイクルで計 44 分程、13 サイクルで計 39 分程、10 サイクルで計 33 分程です。

## 手順

1. セーフストップポイントでの中断後にプロトコルを再開する場合は、シールされた PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心します。
2. ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、今回使用するインデックスアダプタープレートのウェルを覆っているホイルに穴を開けます。

- 以下の分量を、以下の記載順に、PCR プレートの各ウェルに添加します。UDPOXXX をインデックスアダプタープレートから PCR プレートに移します。
  - UDPOXXX (10  $\mu$ L)
  - EPM (20  $\mu$ L)
- ピペティングを 10 回行って混合し、その後シールします。
- 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、PCR プログラムを実行します。各ウェルの液量は 50  $\mu$ L です。

### セーフストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、 $-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$ で保存してください（最長 7 日間）。

## ライブラリーのクリーンアップ

このステップでは、磁気ビーズを用いてデュアルインデックスライブラリーを精製します。

### 消耗品

- RSB (Resuspension Buffer)
- Agencourt AMPure XP
- 用時調製 80% EtOH
- 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- Microseal 'B' シーリングフィルム

### 事前準備

- 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	$2^{\circ}\text{C}$ ～ $8^{\circ}\text{C}$	30 分間静置し、室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	室温で融解します。ボルテックスおよび転倒混和します。

### 手順

- シールした PCR プレートを  $280 \times g$  で 10 秒間遠心します。
- AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 各ウェルに AMPure XP を 50  $\mu$ L 添加します。

4. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
7. 上清を 90 µL 取り除き、廃棄します。
8. 次の手順でビーズを洗浄します。
  - a. 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 µL 添加します。
  - b. 30 秒間待ちます。
  - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. **2 回目**のビーズ洗浄を行います。
10. 20 µL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
11. 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズが乾燥しすぎないように注意してください。
12. プレートを磁気スタンドから下ろします。
13. 各ウェルに RSB を 17 µL 添加します。
14. 次のいずれかの方法で混合します。
  - プレートにシールして 2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。
15. 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後シールします。
16. 室温で 2 分間インキュベートします。
17. 280 × g で 10 秒間遠心します。
18. 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
19. 各ウェルから上清 15 µL を新しいプレートの対応するウェルに移します。

### セーフストップポイント

中断する場合は、プレートをシールし、-25°C ~ -15°C で保存してください（最長 30 日間）。

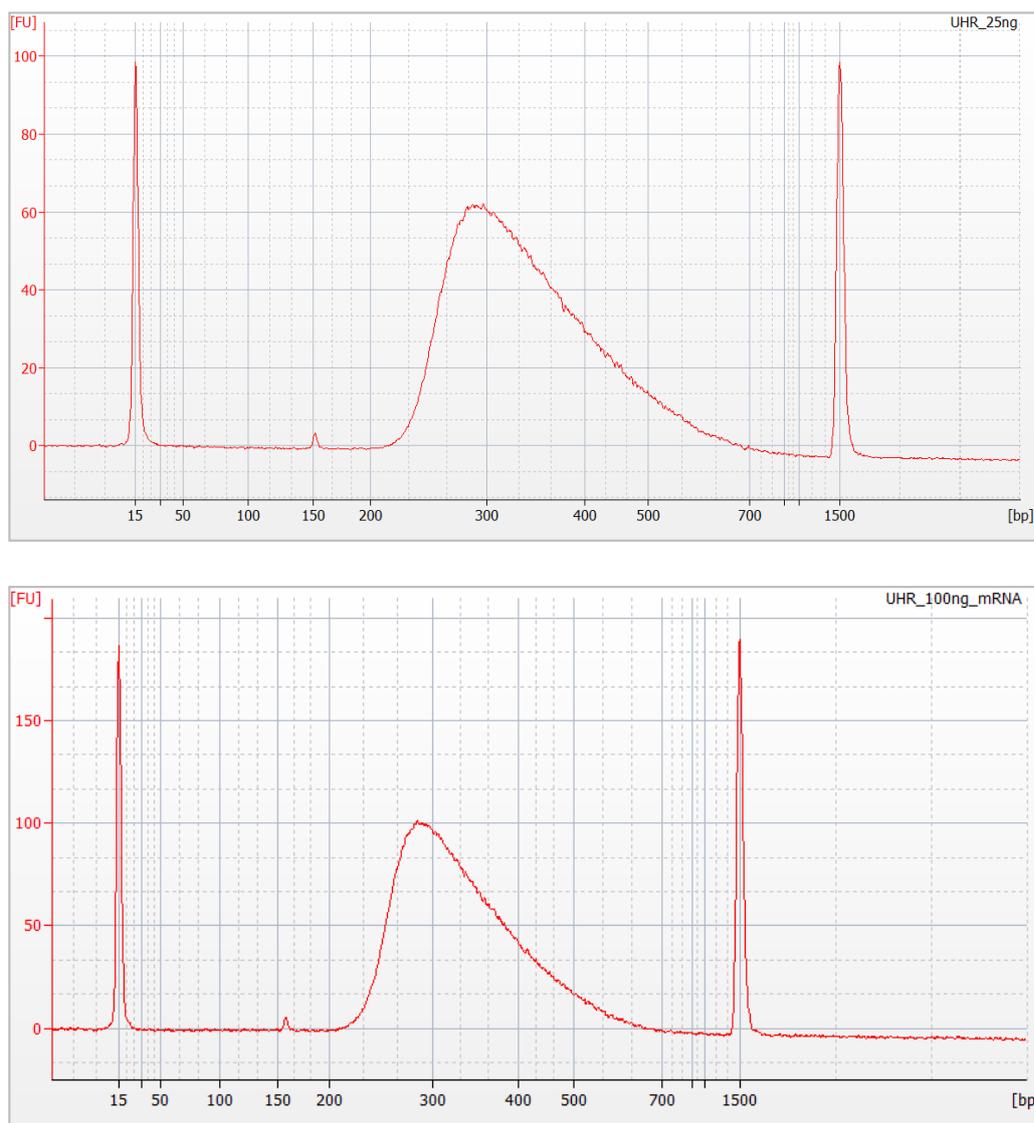
## ライブラリーのチェック

このステップでは、最終ライブラリーの濃度と品質をチェックします。

1. 次のいずれかの方法を用いてライブラリーを解析します。
  - NextSeq 1000/2000 システムを用いる場合は、1 µL のライブラリーを 1:10,000 倍に希釈し、KAPA qPCR Library Quantification Kit を用いてライブラリーを解析します。
  - その他のシーケンスシステムを用いる場合は、Agilent 2100 Bioanalyzer と DNA 1000 Kit を用いて 1 µL のライブラリーを解析します。

下の図は、インプット量 25 ng の Universal Human Reference (UHR) RNA と 100 ng の UHR から調製した最終ライブラリーのトレースの例です。

図 2 Bioanalyzer によるトレースの例（上図はインプット量 25 ng、下図は 100 ng）



2. [オプション] さらなる定量のために、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて、ライブラリー 2  $\mu$ L の解析を行います。Intact RNA サンプルの場合、平均断片長は約 300 ~ 400 bp、想定されるインサートサイズは約 160 bp です。

# ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップでは、NovaSeq 6000、NextSeq 500、NextSeq 550、NextSeq 1000またはNextSeq 2000システムで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。シーケンスにはペアエンドランを推奨します。インデックスリード当たりのサイクル数は10です。リード当たりのサイクル数はシーケンスシステムによって異なります。

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

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

- KAPA Library Quantification qPCR法で定量したライブラリーの場合は、ライブラリーインサートサイズの平均値を300～400 bpとして、計算されたモル濃度を使用します。
- モル濃度を用いて、ライブラリーを使用するシステムの開始濃度に希釈するのに必要なRSBとライブラリーの量を算出します。

シーケンスシステム	開始濃度 (nM)	最終ローディング濃度 (pM)
NextSeq 550/NextSeq 500	1.3	1.1 ~ 1.4
NextSeq 1000/NextSeq 2000	2	750
NovaSeq 6000	0.5	100

- RSBを用いて、それぞれのライブラリーを、使用するシステムに応じた開始濃度に希釈します。希釈したライブラリーそれぞれ10 µLずつを1本のチューブに集めてライブラリーをプールします。
- 使用するシステムの変性希釈手順に従って、ライブラリーを最終ローディング濃度に希釈します。

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2以降を用いる場合かつダークサイクルシーケンスを行わない場合（各インサートリードの1サイクル目にイメージングなしで別の推奨シーケンスレシピを用いる場合）は、必ずT-オーバーハングをトリミングし、5%以上のPhiXを含めてください。ダークサイクルシーケンスの詳細については、『**NextSeq 1000/2000 Sequencing System Guide**』（文書番号：1000000109376）を参照してください。

# T- オーバーハングのトリミング (オプション)

このステップでは、1 サイクル目のヌクレオチドを FASTQ 生成モードでトリミングし、T- オーバーハングを除去します。ダークサイクルシーケンスの詳細については、『**NextSeq 1000/2000 Sequencing System Guide**』(文書番号: **1000000109376**) を参照してください。

Illumina Stranded mRNA により、cDNA インサートに Tヌクレオチドが付加され、cDNA インサートをアダプターに結合できるようになります。Tヌクレオチドの付加によって、各インサートリードの 1 サイクル目における多様性が低下し、これにより、シーケンスの 1 サイクル目のベースコールが不正確になる可能性があります。解析の品質を高めるため、1 サイクル目のヌクレオチドをトリミングすることを推奨します。

1. BaseSpace Sequence Hub 上で FASTQ Toolkit アプリケーションを使用してトリミングを行うには、以下の操作を行ってください。
  - a. base trimming の設定画面を拡大します。
  - b. [Trim reads at the 5-end by n positions] 欄に「1」と入力します。
2. サンプルシートを使用してトリミングを行うには、サンプルシートファイルに次の設定を追加します。
  - Read1StartFromCycle,2
  - Read2StartFromCycle,2

 FASTQ 生成モードは、ラン当たり 1 つの設定にのみ対応しています。ご使用になるライブラリーの設定が間違っていないか確認するため、別のサンプルシートを使用して、T- オーバーハングのないライブラリーでデマルチプレックスを行ってください。

# サポート情報

## はじめに

本ガイドに記載されているプロトコールは、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
A	アデニン
ATL4	A-Tailing Mix
BBB	Bead Binding Buffer
BWB	Bead Washing Buffer
cDNA	相補的 DNA
dsDNA	二本鎖 DNA
dTTP	デオキシチミジン三リン酸
dUTP	デオキシウリジン三リン酸
ELB	Elution Buffer
EPH3	Elute, Prime, Fragment 3HC Mix
EPM	Enhanced PCR Mix
EtOH	エタノール
FSA	First Strand Synthesis Mix
LIGX	Ligation Mix
mRNA	メッセンジャー RNA
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
RIN	RNA Integrity Number
RPBX	RNA Purification Beads
RSB	Resuspension Buffer
SMM	Second Strand Master Mix
STL	Stop Ligation Buffer
T	チミン
UD	ユニークデュアル
UHR	Universal Human Reference

# キットの内容と保管条件

ライブラリー調製を開始する前に、本セクションに記載されている試薬がすべて揃っていることを確認してください。本プロトコールには、Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation キット一式と、IDT for Illumina RNA UD 1 セット以上が必要です。4 セットすべて組み合わせると、最大 384 のライブラリーのインデックス化が可能です。

コンポーネント	製品名	当社カタログ番号
ライブラリー調製	Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples)	20040532
	Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Samples)	20040534
インデックス	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20040553
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20040554
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20040555
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20040556

上記の調製キットには、16 サンプルサイズまたは 96 サンプルサイズ用の mRNA 選択用試薬、cDNA 合成用試薬、ライブラリー調製用試薬が含まれています。インデックスセットには、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターおよびインデックス 2 (i5) アダプター、ならびにライゲーションに必要なアダプターが含まれています。

これらのイルミナ製品には、Agencourt AMPure XP ビーズは含まれていません。サプライヤーについては、[29 ページの「消耗品および機器」](#)をご覧ください。

# Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples) (20040532)

## Illumina PolyA Capture

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時条件	保管条件
1	BBB	Bead Binding Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
1	BWB	Bead Washing Buffer	黄色	2°C～8°C	2°C～8°C
3	ELB	Elution Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
1	AMPure XP	Agencourt AMPure XP	透明	2°C～8°C	2°C～8°C

## Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時条件	保管条件
1	EPH3	Elute, Prime, Fragment 3HC Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	FSA	First Strand Synthesis Mix	茶色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C

## Illumina RNA Prep, Ligation

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時条件	保管条件
1	ATL4	A-Tailing Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	LIGX	Ligation Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	STL	Stop Ligation Buffer	赤色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C

# Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Samples) (20040534)

## Illumina PolyA Capture

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時条件	保管条件
1	BBB	Bead Binding Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
1	BWB	Bead Washing Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
3	ELB	Elution Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
4	AMPure XP	Agencourt AMPure XP	透明	2°C～8°C	2°C～8°C

## Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時条件	保管条件
4	EPH3	Elute, Prime, Fragment 3HC Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	FSA	First Strand Synthesis Mix	茶色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
2	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C

## Illumina RNA Prep, Ligation

数量	試薬	説明	キャップの色	出荷時条件	保管条件
4	ATL4	A-Tailing Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	LIGX	Ligation Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
4	STL	Stop Ligation Buffer	赤色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040553)

数量	説明	出荷時条件	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A (UDP0001–UDP0096)	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040554)

数量	説明	出荷時条件	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B (UDP0097–UDP0192)	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (2004555)

数量	説明	出荷時条件	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C (UDP0193–UDP0288)	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples) (20040556)

数量	説明	出荷時条件	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D (UDP0289–UDP0384)	-25°C～ -15°C	-25°C～ -15°C

# 消耗品および機器

本プロトコールは、本ガイドに記載されている消耗品および機器を用いて最適化と検証がなされています。これら以外の消耗品および機器を使用した場合には、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
1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)	一般的なラボ用品サプライヤー
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
1000 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
96 ウェル twin.tec 250 µL PCR プレート (セミスカート付き)	以下のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>フィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：E951020303</li> <li>VWR、カタログ番号：47744-106</li> </ul>
Agencourt AMPureXP (60 mL)	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63881
Agilent DNA 1000 Kit	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：5067-1504
コニカル遠心チューブ (15 mL または 50 mL)	一般的なラボ用品サプライヤー
無水エタノール (500 mL)	シグマ アルドリッチ、カタログ番号：E7023
Microseal 'B' シーリングフィルム	バイオ・ラッド、カタログ番号：MSB-1001
ヌクレアーゼフリー超純水	一般的なラボ用品サプライヤー
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
RNaseZap <sup>1</sup>	一般的なラボ用品サプライヤー
[オプション] Universal Human Reference RNA ポジティブコントロールサンプル	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：740000
[オプション] Agilent RNA 6000 Pico Kit	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：Q32856
[オプション] Qubit Assay Tubes	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32856
[オプション] Qubit dsDNA BR Assay Kit	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32850 または Q32853
[オプション] KAPA Library Quantification Kit	コンプリートキット (ユニバーサル) カタログ番号：07960140001 または KAPA Library Quantification Kit - qPCR MasterMix (ユニバーサル) および Primer Premix のみ カタログ番号：07960441001 サプライヤー =Roche KAPA Kit：KK4824
[オプション] qPCR 装置	

<sup>1</sup> 表面汚染除去用。

## 機器

機器	サプライヤー
20 µL マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µL シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µL 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 µL シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µL シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
2100 Bioanalyzer System	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：G2939BA
[攪拌ワークフロー] BioShake iQ ハイスピードサーモシェーカー	Q Instruments、カタログ番号：1808-0506
[攪拌ワークフロー] BioShake PCR プレートアダプター	Q Instruments、カタログ番号：1808-1041
以下の磁気スタンドのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>• [攪拌ワークフロー] DynaMag-96 Side Magnet</li> <li>• [ピペットワークフロー] Magnetic Stand-96</li> </ul>	該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> <li>• サーマフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：12331D</li> <li>• サーマフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：AM10027</li> </ul>
マイクロプレート遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の 96 ウェルサーマルサイ클ラーのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler</li> <li>• T100 Thermal Cycler</li> </ul>	該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> <li>• バイオ・ラッド、カタログ番号：1851196</li> <li>• バイオ・ラッド、カタログ番号：1861096EDU</li> </ul>
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
[オプション] Qubit 2.0 Fluorometer	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32866

# テクニカルサポート

技術的な支援については、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)

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

地域	フリーダイヤル	国外
ニュージーランド	+64 800 451 650	
ノルウェー	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
フィリピン	+63 180016510798	
フィンランド	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
フランス	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
米国	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
ベトナム	+84 1206 5263	
ベルギー	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
香港（中国）	+852 800 960 230	
マレーシア	+60 1800 80 6789	

安全データシート (SDS) : 当社のウェブサイト ([jp.support.illumina.com/sds.html](http://jp.support.illumina.com/sds.html)) から入手できます。  
製品マニュアル : [jp.support.illumina.com](http://jp.support.illumina.com) よりダウンロード可能です。





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

**本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。**

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

**illumina®**