



# ターゲットシーケンスとは？

## 全ゲノムシーケンス

### 特長

- ゲノム全領域をシーケンス
- ゲノム全体にわたる変異解析

### 考慮すべき点

- サンプルスループット
- カバレッジは通常 30x程度
- シーケンス費用がかかる

### 例

- ヒト全ゲノムシーケンス
- 微生物 de novo シーケンス
- 動植物リシーケンス など

## ターゲットシーケンス

### 特長

- 領域を絞ってシーケンス
- 高いカバレッジの解析が可能  
(低頻度変異の検出など)

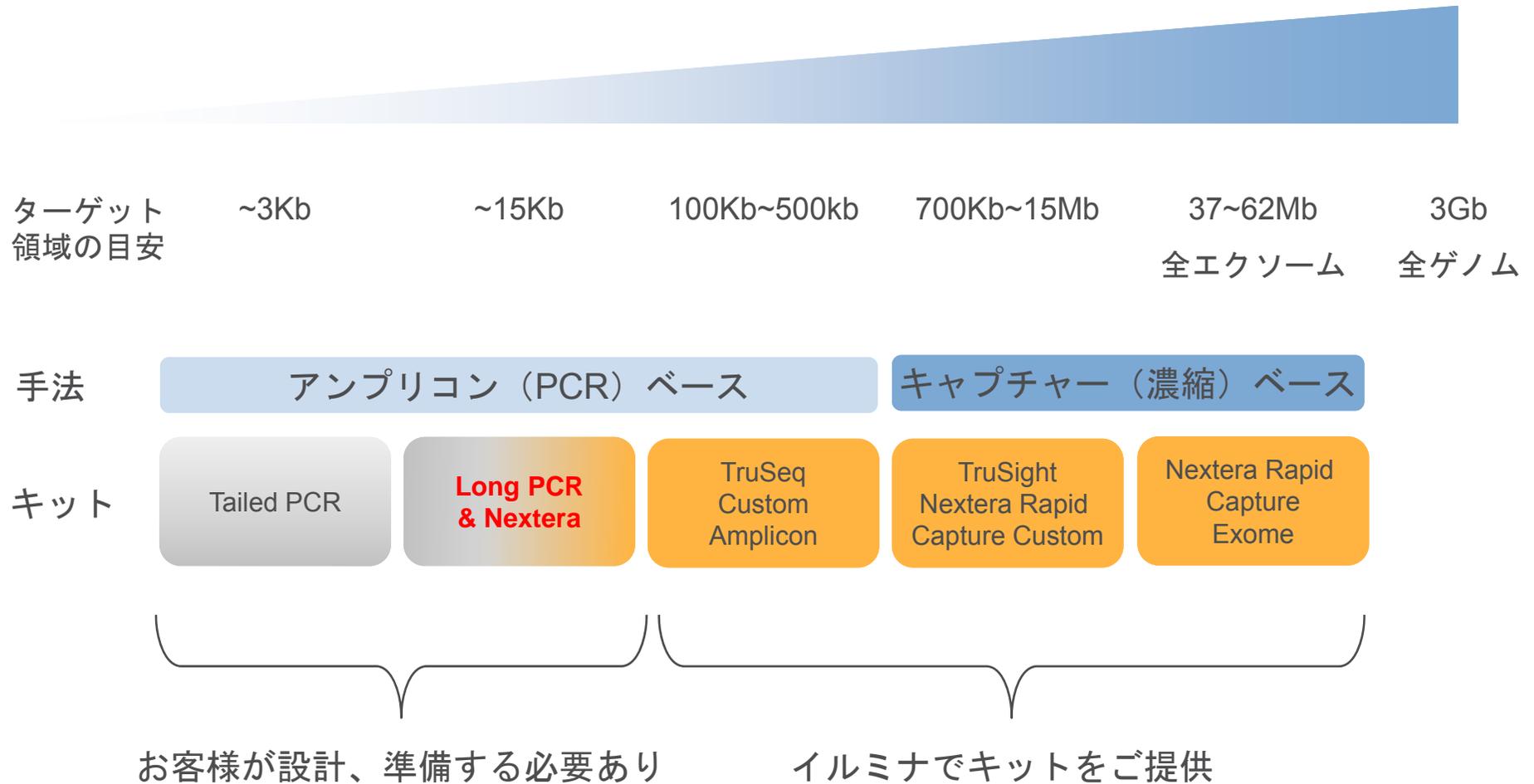
### 考慮すべき点

- 領域外の変異情報のアクセス
- ゲノム網羅的解析（コピー数）が難しい
- カバレッジにむらがある
- 前処理（ライブラリー調製）に工夫が必要

### 例

- エクソームシーケンス
- 疾患別パネル
- 16S 菌叢解析 など

# 目的とするターゲット領域ごとに適した手法を選択



# TruSeq Ampliconよりも小さいターゲット領域の解析

お客様がご自由にプライマーを設計いただきライブラリーを調製する方法です。

## ▶ Tailed PCR 法

- 以前のサポートウェビナーにてご案内済みです。
- ~550bp程度の断片にTailed PCRを使用してイルミナNGSで解析するためのアダプターを付加します。

## ▶ Long Range PCR+Nextera法

- **今回のウェビナーでご紹介します。**
- 長鎖の断片をLong Range PCRで増幅し、Nextera Kitを使用してインデックスとアダプターを付加する方法です。

(注意) これら二つの手法はカスタムプライマーを使用するなどお客様のデザインが影響を与えますので、フィールドアプリケーション担当、テクニカルサポート部ではサポートが限られる旨ご了承ください。

# [以前のウェビナー] Tailed PCR (～3Kbまでの領域を対象)

- ▶ Tailed PCR とは？
  - PCR 増幅する際に、イルミナ次世代シーケンサーに対応したアダプターを入れる
  - PCR 増幅のおすすめサイズ： 100～550bp程度、最大 700bpぐらいまで
- ▶ イルミナ次世代シーケンサーに対応したアダプターをいれるには
  - **Nexteraアダプター：2ステップでPCR増幅およびアダプター付加を実施**
  - TruSeqアダプター：1 or 2ステップでPCR増幅およびアダプター付加を実施
  - カスタムアダプター：論文などを参照して利用

どのアダプターが  
よいのか？

↓  
以前のウェビナーにて  
詳細をご案内しています。



## サポート用ウェビナー (www.illumina.co.jp/webinar)

2014/06/13

NGSの新たな利用法

「Tailed PCR法を用いたライブラリー調製」

イルミナ株式会社 テクニカル アプリケーション サイエンティスト

小林孝史

Tailed PCR法は、サンプル調製キットを使用せずにPCRプライマーにアダプター配列を組み込むことでDNAライブラリーを作製する手法で、領域を絞って多サンプル解析を行う際に適しています。その実用例とプロトコルをご紹介します。

# Long Range PCR + Nextera (3Kb~の領域を対象)

- ▶ Long Range PCR + Nexteraとは？
  - 比較的大きな領域に対して、ロングレンジのPCRを実施
  - その後、イルミナのNexteraシリーズのライブラリー調製キットを使う
    - Nextera DNA Sample Prep Kit + Nextera Index Kit
    - Nextera XT Sample Prep Kit + Nextera XT Index Kit
- ▶ Tailed PCRより、広めの範囲をカバーできる



## ポイント

- ターゲットとする領域と、その周辺 200~300bp 領域を対象に増幅することをおすすめ

# Long Range PCR & Nextera のながれ

## プライマーの 設計および注文

- ターゲット領域ぎりぎりではなく、両端100~150bp程度余裕を持たせて設計

## Long Range PCR

- TaKaRa PrimeSTAR GXL DNA Polymerase  
(などのLong Range PCR用酵素) を用いてPCR

所要時間: PCRの長さによって異なります

## Nextera ライブラリー 調製

- **Nextera XT** DNA Sample Prep Kit (ビーズ精製で簡単に濃度をそろえたい)
- **Nextera** DNA Sample Prep Kit (カバレッジをより平均的に得たい)

所要時間: 半日程度

## MiSeq シーケンス (PCR Amplicon)

- MiSeq Reporter 内の PCR Amplicon ワークフローで解析  
(全ゲノムの内、ターゲット領域を指定するマニフェストファイルを作成)

所要時間: 5時間 (1x50bp) ~ 56時間 (2x300 bp)

# Long Range PCR には TaKaRa PrimeSTAR GXLが最適との報告

- ▶ Scientific Rep.4: 5737- (Jul 2014)
  - Long Range PCR用の6種類のPCR酵素を比較
    - Invitrogen SequelPrep
    - Invitrogen AccuPrime
    - TaKaRa PrimeSTAR GXL
    - TaKaRa LA Taq Hot Start
    - KAPA Long Range Hot Start
    - QIAGEN Long Range PCR polymerase
  - 対象はBRCA1/2遺伝子全長
  - **TaKaRa PrimeSTAR GXL DNA Polymeraseが増幅効率が良いと報告**
    - 幅広いTm・断片長(5.8kb-12.9kb)
    - 30サイクル



**OPEN** Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer

SUBJECT AREAS:  
NEXT-GENERATION SEQUENCING  
BIOINFORMATICS

Haiying Jia<sup>1,2</sup>, Yunfei Guo<sup>2,3</sup>, Weiwei Zhao<sup>4</sup> & Kai Wang<sup>2,3,5</sup>

Received  
14 May 2014  
Accepted  
24 June 2014  
Published  
18 July 2014

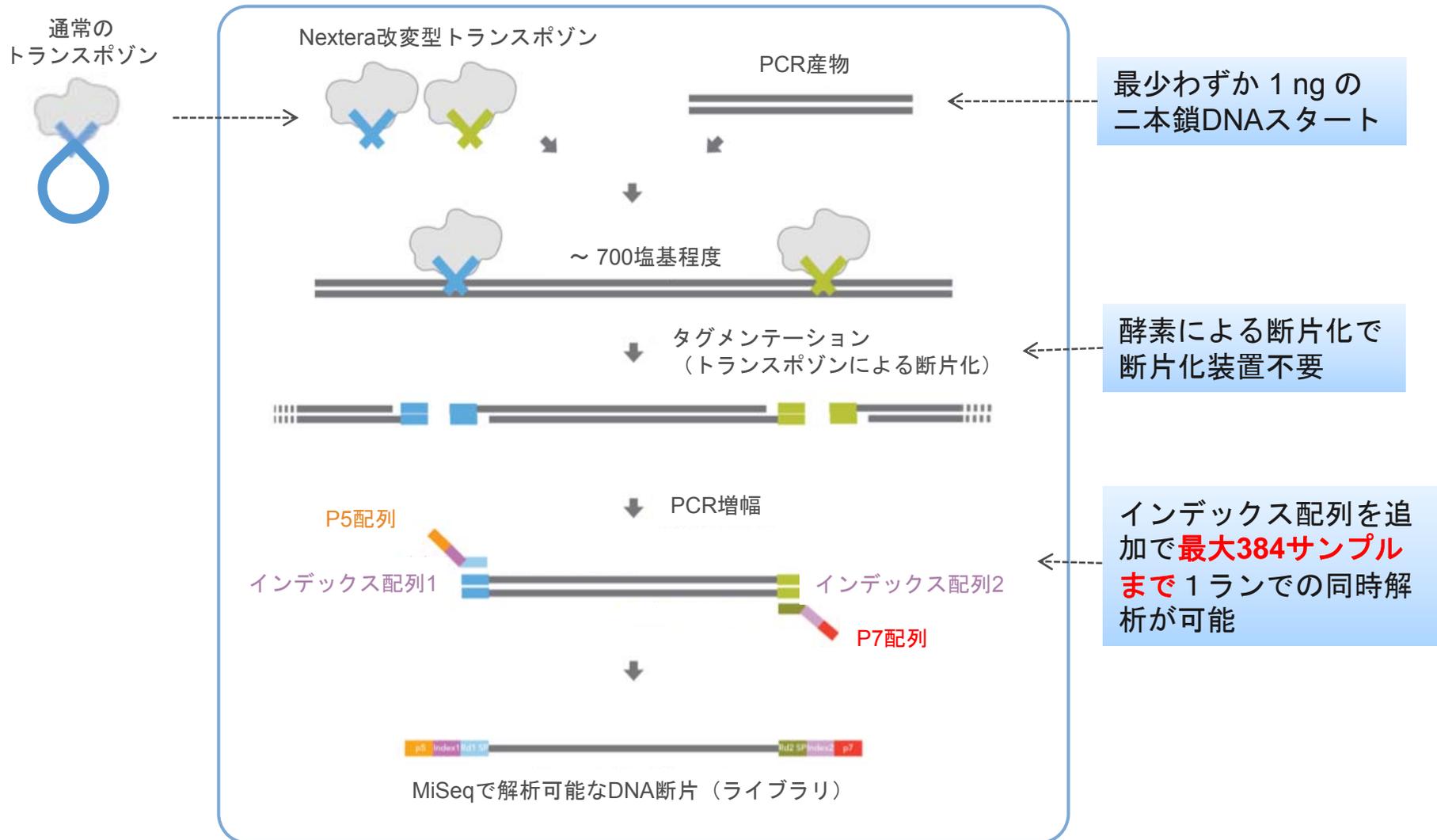
<sup>1</sup>The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China, <sup>2</sup>Zilkha Neurogenetic Institute, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA, <sup>3</sup>Department of Preventive Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA, <sup>4</sup>Kingmed Diagnostics, Guangzhou, Guangdong 510330, China, <sup>5</sup>Department of Psychiatry, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.W. (kaiwang@usc.edu)

Long-range PCR remains a flexible, fast, efficient and cost-effective choice for sequencing candidate genomic regions in a small number of samples, especially when combined with next-generation sequencing (NGS) platforms. Several long-range DNA polymerases are advertised as being able to amplify up to 15 kb or longer genomic DNA. However, their real-world performance characteristics and their suitability for NGS remain unclear. We evaluated six long-range DNA polymerases (Invitrogen SequelPrep, Invitrogen AccuPrime, TaKaRa PrimeSTAR GXL, TaKaRa LA Taq Hot Start, KAPA Long Range HotStart and QIAGEN LongRange PCR Polymerase) to amplify three amplicons, with sizes of 12.9 kb, 9.7 kb, and 5.8 kb, respectively. Subsequently, we used the PrimeSTAR enzyme to amplify entire BRCA1 (83.2 kb) and BRCA2 (84.2 kb) genes from nine subjects and sequenced them on an Illumina MiSeq sequencer. We found that the TaKaRa PrimeSTAR GXL DNA polymerase can amplify almost all amplicons with different sizes and Tm values under identical PCR conditions. Other enzymes require alteration of PCR conditions to obtain optimal performance. From the MiSeq run, we identified multiple intronic and exonic single-nucleotide variations (SNVs), including one mutation (c.5946delT in BRCA2) in a positive control. Our study provided useful results for sequencing research focused on large genomic regions.

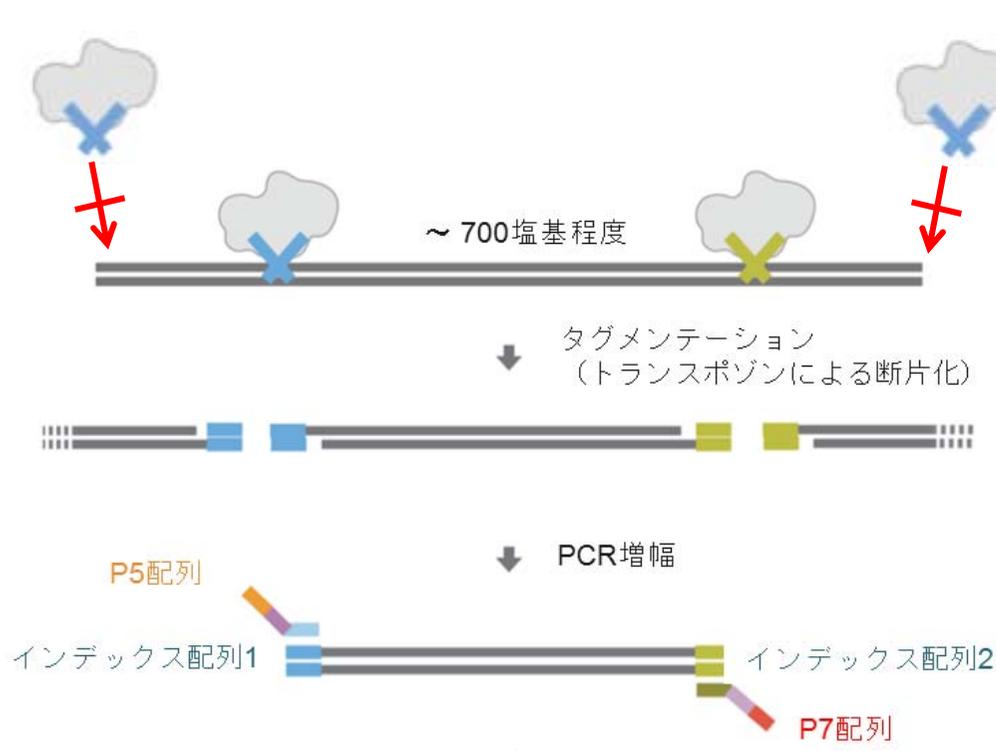
弊社が実験データを保証するものではありません。参考資料としてご使用ください。

# Nexteraの原理

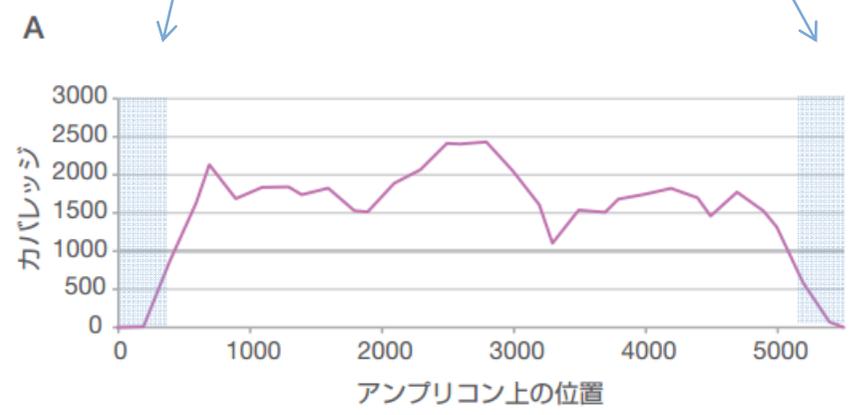


参考文献 Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. Genome Biology 2010 Dec 8;11(12):R119.

# ポイント：両端ぎりぎりにLong Range PCRプライマーを設計しないように！



トランスポゾンがDNAの両端に対して作用する  
↓  
両末端のカバレッジが低くなる

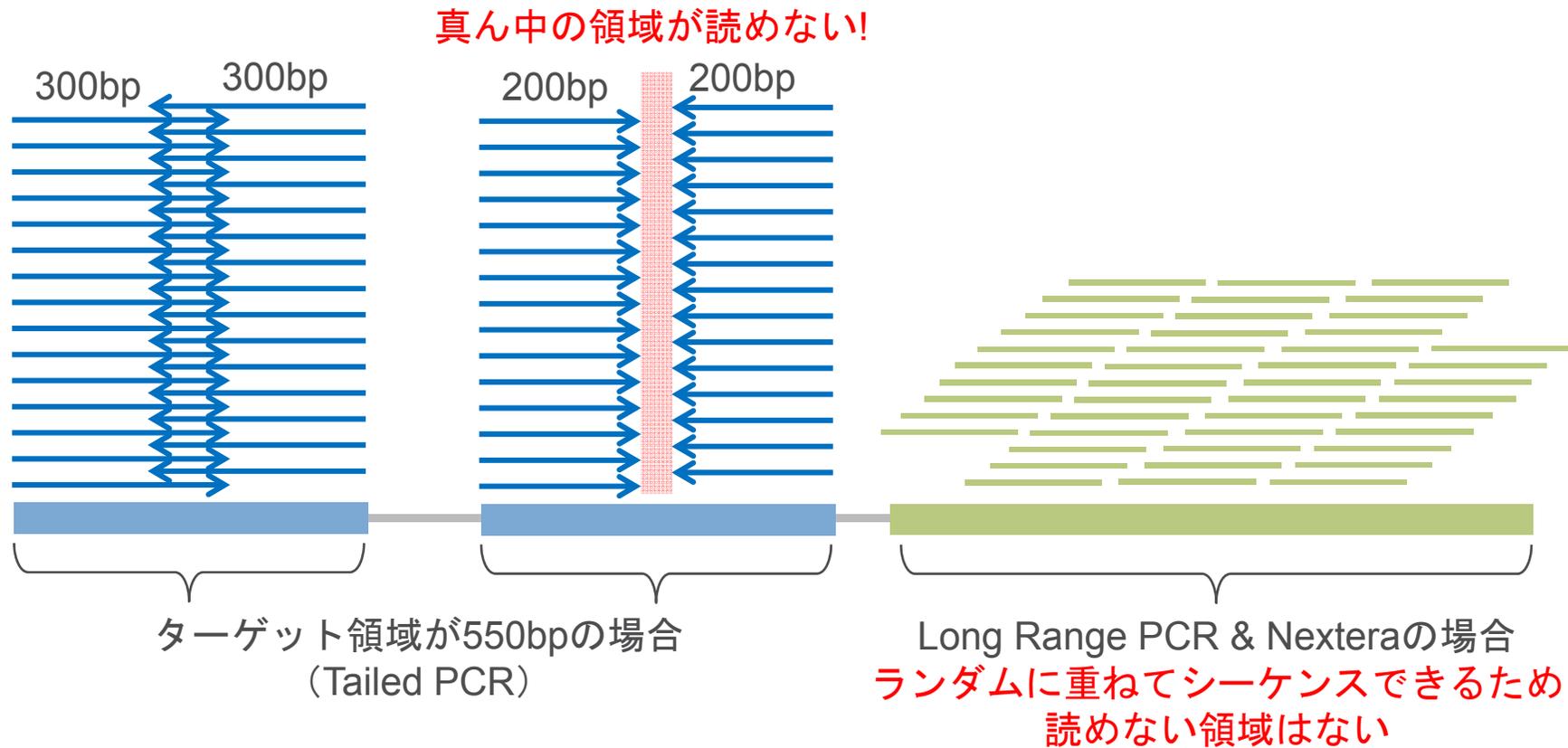


参考文献: Nextera XT sample prep kit product data sheet  
[http://www.illumina.com/documents/pdf/datasheet\\_nextera\\_xt\\_dna\\_sample\\_prep-j.pdf](http://www.illumina.com/documents/pdf/datasheet_nextera_xt_dna_sample_prep-j.pdf)



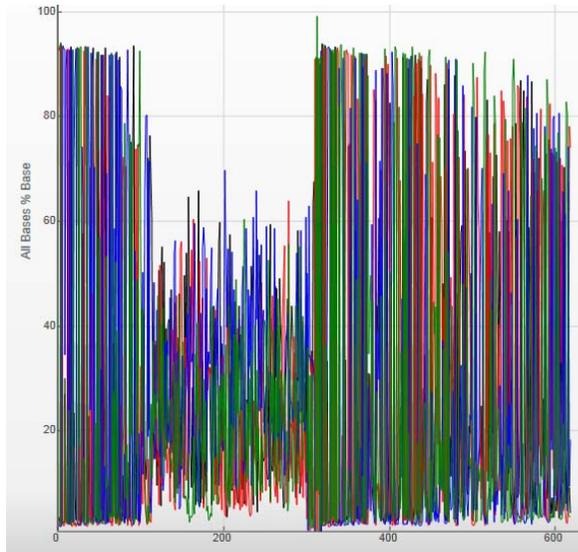
# Long Range PCR & Nextera だと、 データトリミングの影響は受けない

MiSeq 300bp x2 で解析した例  
300bpのリードをトリミングすると...

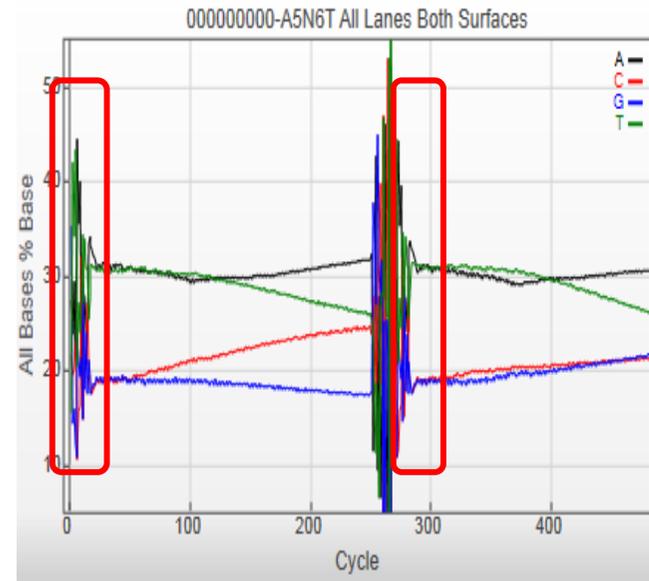


# 注意：多様性の低いライブラリー

**Tailed PCR由来のサンプル**  
塩基の多様性が低くなりがち：  
PhiXを加えることで対策



**Long Range PCR & Nextera**  
の場合に想定されるグラフ  
リードの最初が多様性が低くなる傾向



## ポイント

- 主にトランスポゾムでの切断時に生じる偏りで、データに与える偏りは小さい
- 通常のクラスター密度であれば大きくデータに影響することはない
- クラスター密度が非常に高い場合には、通常のサンプルと比べてクオリティ値が下がる場合がある

# MiSeq Reporterでの解析例 (HiSeqで解析の場合は他の解析パイプラインが必要です)

The screenshot shows the Illumina Experiment Manager (IEM) interface. The main window displays a table with sample details. The 'Sample Sheet Status' section shows the status as 'Valid'.

**サンプルシート作成完了**

Sample ID*	Sample Name	Workflow	Application	Assay	Descriptor	Chemistry
A-BRCA1	1	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default
A-BRCA2	2	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default
B-BRCA1	3	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default
B-BRCA2	4	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default
C-BRCA1	5	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default
C-BRCA2	6	PCR Amplicon	PCR Amplicon	Nextera XT	Long Range PCR	Default

**[Manifests]**  
A 11\_AmpliconManifest

**[Reads]**  
151  
151

**[Settings]**  
FlagPCRD 0  
VariantFilter 30  
outputgen FALSE  
Adapter CTGTCTTTATACACATCT

**[Data]**

Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	I7_Index_ID	index	Manifest	Genome	Sample_Prc	Description
A-BRCA1	1			N701	TAAGGCG:A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			
A-BRCA2	2			N702	CGTACTA(A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			
B-BRCA1	3			N703	AGGCAGA:A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			
B-BRCA2	4			N704	TCCTGAG(A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			
C-BRCA1	5			N705	GGACTCC:A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			
C-BRCA2	6			N706	TAGGCAT(A	Ho mo_sapie ns¥UCSC¥hg1 9¥Se que nce¥Who leGe no me FASTA			

# Manifest File の作成 (PCR amplicon workflow使用の際に必要なになります)

- マニフェストファイルは、参照ゲノムファイルのターゲット領域を設定するもの
- リファレンスとして参照する配列を、簡単なステップで作成

Genome  
Homo\_sapiens#UCSC#hg19#Sequence#WholeGenomeFasta

Manifest Entries

id	Amplicon Name	Chromosome	Amplicon Start	Amplicon End	Upstream Probe Length $\Delta$	Downstream Probe Leng
1	Amplicon 1	chr17	41194339	81195210	50	50
2	Amplicon 2	chr17	41207139	41215625	50	50

Add Blank Row Remove Selected Rows

Name for this manifest:  
BRCA1.1

OK Cancel

## Step 1

全ヒトゲノムなどのデータベースを選択\*

## Step 2

ターゲットとする領域を簡単操作に設定

\* 別途使用するファイルを作成し、追加して選択することも可能です。

# MiSeq付属ソフトMiseq Reporterで わかりやすい出力ファイルを作成

**ズームイン、アウト**

**サンプルの表**

#	Sample ID	Sample Name	Cluster PF	Cluster Align	Mismatch	NoCall	Coverage	Het SNPs
1	1471-8	NA18507	392811	375878/373876	6.33/5.60	0.00/0.00	7054.3	7
2	1471-9	NA18507	385626	368805/367004	6.15/5.43	0.01/0.00	6923.5	6
3	1471-10	NA18507	416699	398407/395788	6.17/5.45	0.00/0.00	7472.4	6

**ターゲットの表**

#	Target ID	Chr	Start Position	End Position	Cluster PF	Mismatch
1	cftr_Exon (1738681)_725155.1	chr7	117234943	117235196	98198/98915	0.83/0.36
2	Intron22_UserDefined (1896016)_725169.1	chr7	117279984	117280248	110640/109594	0.43/0.45
3	cftr_Exon (1738689)_725127.1	chr7	117227758	117228020	54024/54247	0.37/0.38

**カバレッジとミスマッチ**

**クオリティ値**

**SNP/indel アノテーション**

**サンプルおよび変異**

#	Sample ID	Sample Name	Chr	Position	Score	Variant Type	Call	Frequency	Depth	Filter
1	1471-8	NA18507	chr7	117235055	3070	SNP	T->T			

- アライメントは Smith-Waterman
- 変異コールはGATKが初期設定、体細胞性変異はStarling

# Long Range+Nexteraを使用してミトコンドリアを解析する

従来はサンガー法で解析されることが多かった。

→イルミナNGSにシフト！

カバレッジが深くなるためにヘテロプラスミーなども解析可能に。

## 用途

- ▶ ミトコンドリアゲノム解析は法医学的に有用
  - 細胞内コピー数が多い
  - 変異レートが小さい
  - 母型のみのアレルが遺伝される
- ▶ (たとえば)ベトナム、コソボ地方、ソマリアなどの多数の遺体を収納するお墓から骨としてサンプルを収集。
  - 骨からミトコンドリアゲノムを回収し同定する。
  - ミトコンドリア全ゲノムを解析するか、D-loop領域を解析する。

Application Note: Sequencing illumina®

## Analysis of Skeletal Remains Using Deep mtDNA Sequencing

MISeq® system aids in identification of skeletal remains by sequencing mtDNA hypervariable regions.

**Introduction**

Forensic researchers face significant challenges in identifying unknown remains found in mass graves, such as those located in the war-torn countries of Vietnam, Kosovo, and Somalia. Dental records and circumstantial evidence are often inconclusive. DNA collected from skeletal samples is typically highly degraded, contaminated, and present in small quantities. The poor quality of these samples limits the success of conventional short tandem repeat (STR) typing techniques. In contrast, mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing is quite useful in analyzing these samples, offering the following advantages:

- It is abundant and present in hundreds of copies per cell compared to nuclear DNA.
- It has a low mutation rate.
- It is maternally inherited and does not undergo sexual recombination, enabling maternal relationships to be established across generations.

For years, forensic laboratories have used capillary electrophoresis (CE)-based Sanger sequencing to perform mtDNA analysis. While the full mtDNA genome is approximately 16 kb, the hypervariable I and II (HVI and HVII) regions are usually the targets of mtDNA sequencing for human identification. These regions are located within a 1.1 kb region called the "D-loop". Capable of providing deeper coverage of specific regions of interest, next-generation sequencing (NGS) systems enable mtDNA sequencing to be performed at a high throughput, using simpler workflows.

The Illumina MISeq system is a fully integrated NGS instrument, providing a rapid workflow and streamlined sample preparation that is ideal for sequencing small genomes and amplicon samples, such as the D-loop region of mtDNA. This application note describes the use of the MISeq system for deep sequencing of the HVI and HVII regions in mtDNA and how this technique is being used to aid the identification of human skeletal remains found in mass graves in Vietnam (Figure 1).

**mtDNA Sequencing of Bone Fragments**

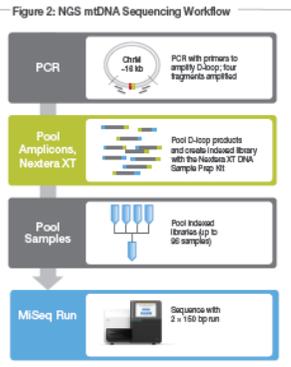
Forensic scientists used the MISeq system to sequence bone fragments uncovered at a mass grave site in Vietnam after DNA analysis of the samples using CE-based sequencing failed. The process began with the extraction of total DNA from blood and bone samples using established methods. Four individual amplicons spanning the HVI and HVII regions were amplified from mtDNA using PCR primers specific to the D-loop/Control region<sup>12</sup> (Figure 2). Library preparation was performed using the Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit. The samples were then sequenced on the MISeq system using

**Figure 1: Recovery of Human Remains**



MISeq technology is helping to identify human skeletal remains such as these, recovered in Vietnam. There are an estimated 300,000 unidentified human skeletal remains lying in mass graves across Vietnam.

**Figure 2: NGS mtDNA Sequencing Workflow**



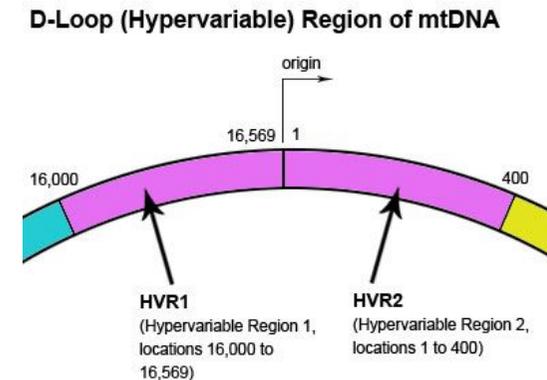
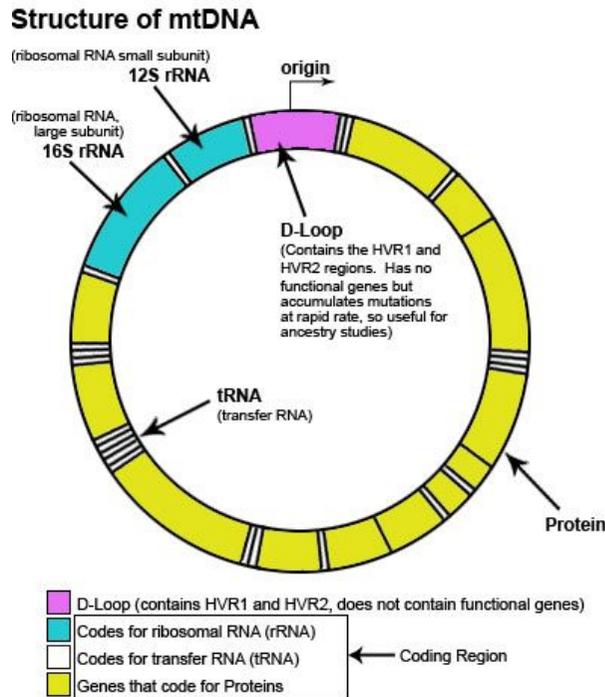
Specific amplicons spanning the HVI and HVII regions were sequenced on the MISeq system using a 2 x 150 bp run protocol.

[http://applications.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote\\_vietnam\\_mtDNA.pdf](http://applications.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote_vietnam_mtDNA.pdf)

# ミトコンドリア全ゲノムを解析するか D-Loop領域のみを解析するか？

ミトコンドリア全長(16kb)を解析するか？

D-loop領域(1.1kb)のみを解析するか？



D-loop領域(1.1kb)  
遺伝子をコードしない領域で  
二つの超可変領域 (HVI/HVII) を持ち  
変異が多様であるため遺伝情報を多く有する

正確性を重視

さらに多サンプル解析が可能

- 1) mtDNA and its role in ancestry. *Genebase Tutorials*. Retrieved October 1, 2014, from <http://www.genebase.com/learning/article/17>
- 2) *Journal of Human Genetics* **56**, 689-694



# Long Range PCR & Nextera プロトコール例-1 (ヒト全ミトコンドリアDNA解析)

- ▶ ヒトミトコンドリアDNAの全長を解析 (16,569 bp)
  - 2つの Long Range PCR で増幅
  - 9.1kb & 11.2kb
  - Takara LA Taq にて増幅
- ▶ Long Range PCR 後にイルミナNextera XTにてライブラリーを作成
  - Nextera XT DNA Sample Prep Kit
  - Nextera XT Index Kit
- ▶ シーケンス
  - MiSeq 150bp x2
  - MSR (MiSeq Reporter Software) mtDNAプラグインにて二次解析
  - mtDNA Variant Analyzer にて出力

## Human mtDNA Genome For the Illumina Sequencing Platform

Introduction	2
Workflow	3
Sample Sheet	4
First PCR Amplification	6
Quantity	9
Tagment Amplified DNA	11
Limited-Cycle PCR Amplification	13
Limited-Cycle PCR Clean-Up	17
Bead-based Normalization	19
Pool and Load from Bead-based Normalization	23
Bioanalyzer-based Normalization	25
Pool and Load from Bioanalyzer-based Normalization	27
Analysis	29
Supporting Information	36

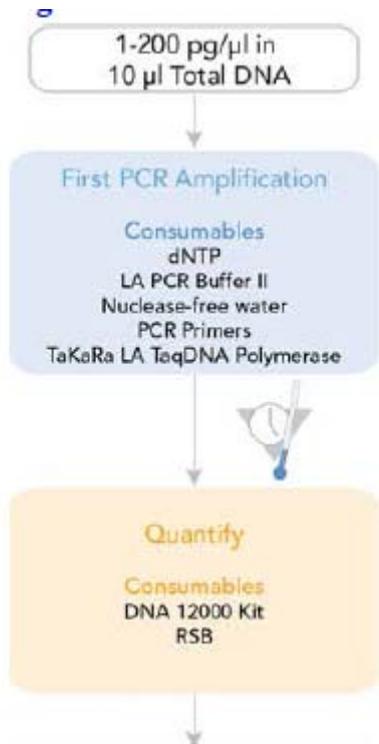
**IMPORTANT NOTICE** This document provides information for an application for Illumina technology that has been demonstrated internally and may be of interest to customers. This information is provided as-is and is not an Illumina product and is not accompanied by any rights or warranties. Customers using or adapting this information should obtain any licenses required and materials from authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, this application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

Part # 15037958 Rev. B

Page 1

[http://support.illumina.com/downloads/human\\_mtdna\\_genome\\_guide\\_15037958.html](http://support.illumina.com/downloads/human_mtdna_genome_guide_15037958.html)

# Step1) PCR断片の増幅



ヒトミトコンドリアDNAの全長（16,569 bp）をオーバーラップ含めて2つの断片としてLong Range PCR (30 cycle) にて増幅。

MTL-F1+ MTL-R1: 9065 bp  
 MTL-F2+ MTL-R2: 11170 bp

の断片がそれぞれ得られる。

Primer	Sequence
MTL-F1	5'- AAA GCA CAT ACC AAG GCC AC -3'
MTL-F2	5'- TAT CCG CCA TCC CAT ACA TT -3'
MTL-R1	5'- TTG GCT CTC CTT GCA AAG TT -3'
MTL-R2	5'- AAT GTT GAG CCG TAG ATG CC -3'

<sup>1</sup>Stawski, H., B. J. Bintz, E. S. Burnside, and M. Wilson. 2013. Preparing Whole Genome Human Mitochondrial DNA Libraries for Next Generation Sequencing (NGS) Using Illumina Nextera XT. Poster presentation at the 65th Annual American Academy of Forensic Sciences Conference. In: Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences. Washington, D.C. [www.aafs.org/sites/default/files/pdf/ProceedingsWashingtonDC2013.pdf](http://www.aafs.org/sites/default/files/pdf/ProceedingsWashingtonDC2013.pdf)









# Long Range PCR & Nextera プロトコール例-2 (ヒトミトコンドリアD-loop領域解析)

- ▶ ミトコンドリアのD-Loop領域 (1.1kb) をオーバーラップした350bp程度の 4 種類のアンプリコンに分けて増幅。
- ▶ Long Range PCR 後にイルミナNextera XTにてライブラリーを作成
  - Nextera XT DNA Sample Prep Kit
  - Nextera XT Index Kit
- ▶ シーケンス
  - MiSeq 150bp x2
  - MSR (MiSeq Reporter Software) mtDNAプラグインにて二次解析
  - mtDNA Variant Analyzer にて出力

## Human mtDNA D-loop Hypervariable Region

For the Illumina Sequencing Platform

Introduction	2
Workflow	3
Sample Sheet	4
First PCR Amplification	6
First PCR Clean Up	10
Quantify	12
Tagment Amplified DNA	14
Limited-Cycle PCR Amplification	16
Limited-Cycle PCR Clean-Up	20
Bead-based Normalization	23
Pool and Load from Bead-based Normalization	27
Bioanalyzer-based Normalization	29
Pool and Load from Bioanalyzer-based Normalization	31
Analysis	33
Supporting Information	40

**IMPORTANT NOTICE** This document provides information for an application for Illumina technology that has been demonstrated internally and may be of interest to customers. This information is provided as-is and is not an Illumina product and is not accompanied by any rights or warranties. Customers using or adapting this information should obtain any licenses required and materials from authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, this application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

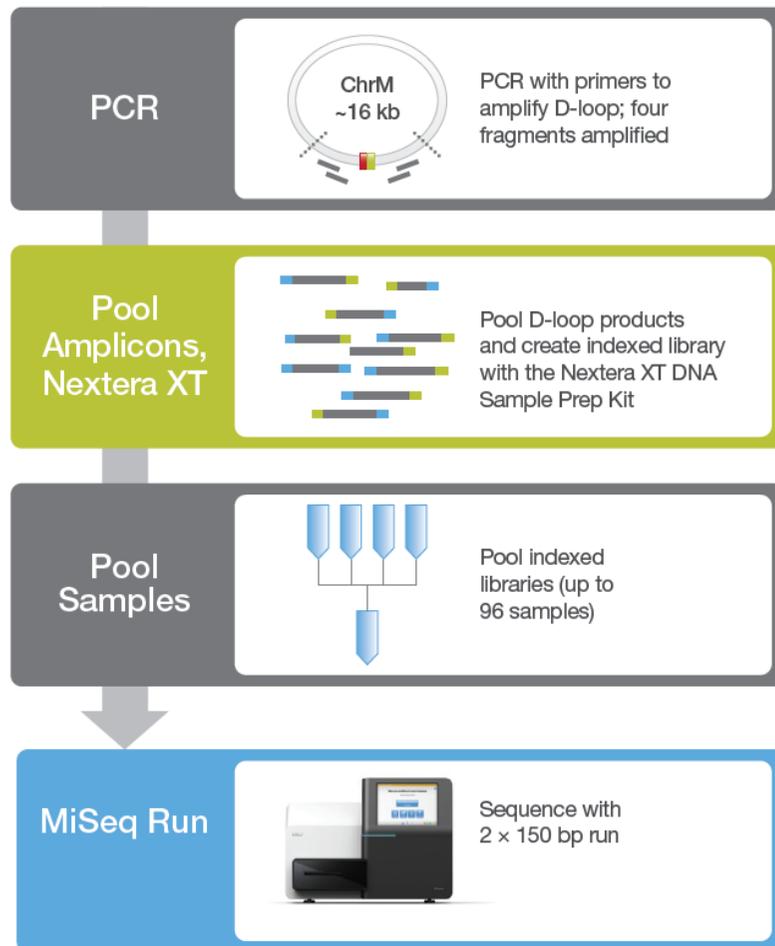
Part # 15034858 Rev. B

Page 1

[http://support.illumina.com/downloads/human\\_mtdna\\_d\\_loop\\_hypervariable\\_region\\_guide\\_15034858.html](http://support.illumina.com/downloads/human_mtdna_d_loop_hypervariable_region_guide_15034858.html)



# D-Loop領域解析のワークフロー



ミトコンドリアゲノム領域(16kb)中のD-loop領域のみを4種類のPCR断片(350bp)を増幅する

PCR断片をまとめてNextera XT Sample Prep Kitでライブラリーを作製する。

最多96サンプル（現在は384サンプル）をプール。

MiSeq V2 kit, 2x150 bpで解析。  
サンプルあたり1万Read以上で解析。

[http://applications.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote\\_vietnam\\_mtDNA.pdf](http://applications.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote_vietnam_mtDNA.pdf)



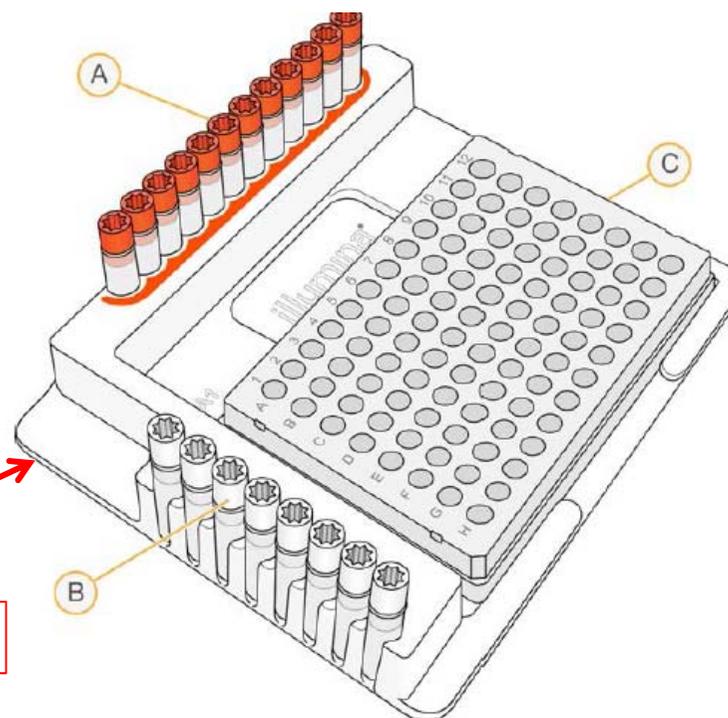
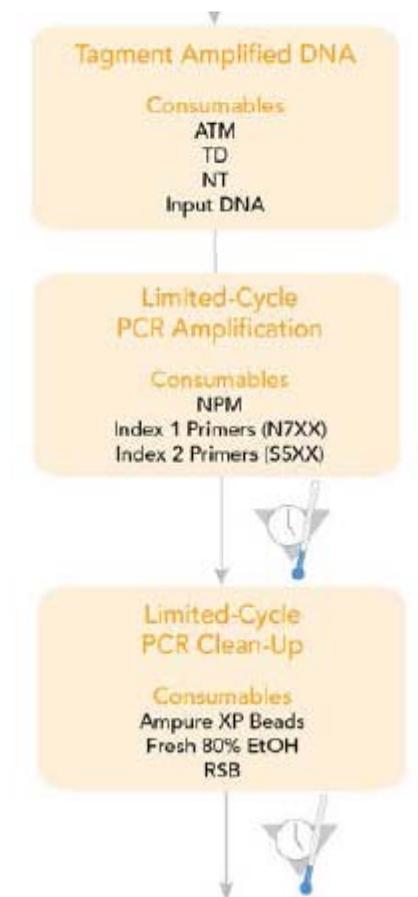


## Step2) PCR断片からNextera XT Kitを使用してライブラリ作製

ワークフローはNextera XT DNA Sample Prep Kitと同様です。

インデックスプライマーの添加もTruSeq Index Plate Fixtureを使用して簡単に行えます。

12 cycleのPCR反応を実施。



TruSeq Index Fixture Plate

- A Index primer 1 (i7) (orange caps)
- B Index primer 2 (i5) (white caps)
- C NTA plate

# Step3) サンプル数に応じてノーマライゼーション

最終的に得られるライブラリーサイズは150~450bp程度となります。

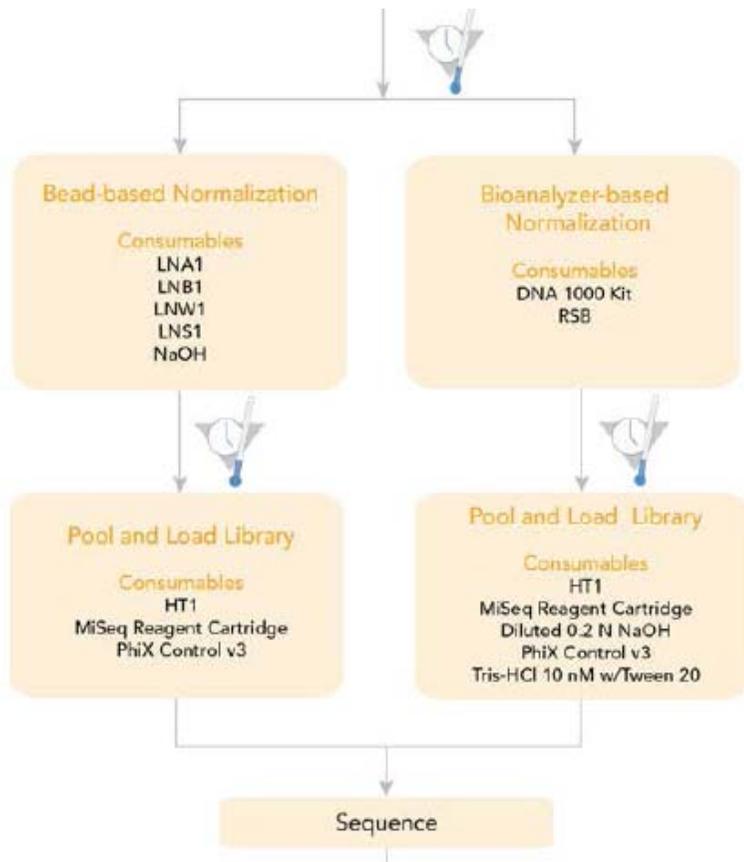
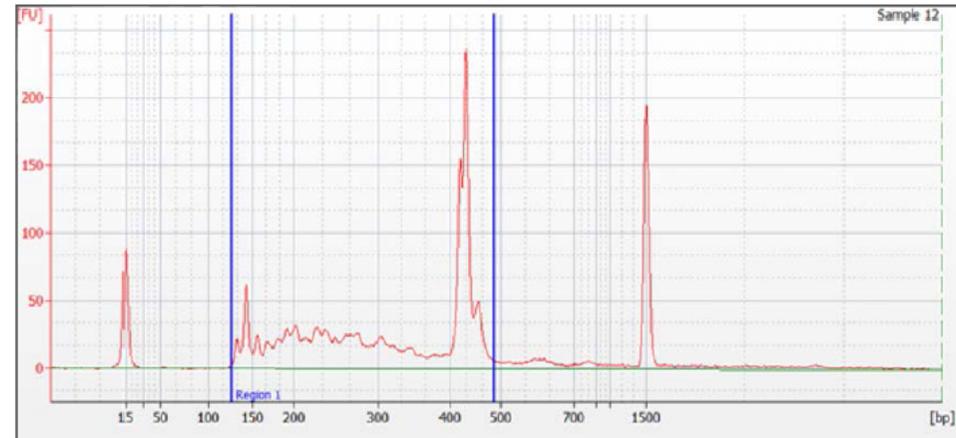


Figure 6 Example Region Of Interest



サンプル数)

少量: 変性してマニュアル操作でプール

[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote\\_nextera\\_library\\_validation.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_nextera_library_validation.pdf)

多量: Nextera XT Sample Prep Kit同封のNormalization Beadsを使用。→変性操作が必要ありません。





## まとめ

今回のウェビナーでは、Long Range PCR+Nexteraのアプリケーションにつきまして下記をご案内いたしました。

- ▶ ターゲット領域がTruSeq Custom Ampliconよりも小さく、Tailed PCRよりも大きい際に有効です。
- ▶ プロジェクトに沿ったプライマーペア、Nextera XT DNA Sample Prep Kit, Nextera XT Index Kit (V1あるいはV2)の準備が必要です。
- ▶ 細かいプロトコールはmtDNA解析のプロトコールを参照ください。
- ▶ カスタムプライマーを使用するなどお客様のデザインが影響を与えますので、フィールドアプリケーション担当、テクニカルサポート部ではサポートが限られる旨ご了承いただけたらと思います。

ご清聴頂きありがとうございました。  
しばらくご質問をいただく時間を設けます。