

トラブルシューティング編 Nexteraライブラリー調製キットシリーズで 期待通りのライブラリーを得るためのヒント

March 6, 2015

150511 RevB: 一部修正



小林 孝史
イルミナ株式会社テクニカルサポート部
テクニカルアプリケーション サイエンティスト

© 2014 Illumina, Inc. All rights reserved. Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, ForenSeq, MiSeq, MiSeqDx, MiSeqFGx, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®



本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコルの取得方法。プロトコル上の注意

本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

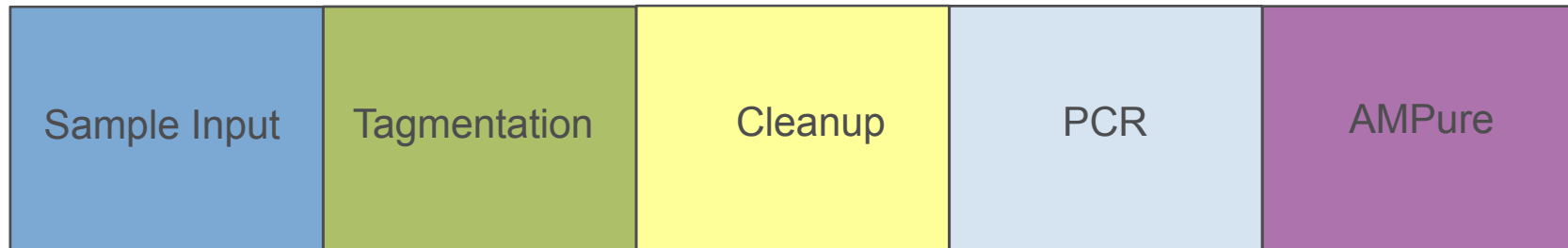
- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコルの取得方法。プロトコル上の注意



Nexteraキットのワークフロー



- ❖ プロトコールは、大まかに5つのステップに分かれます。
- ❖ 90分以内でライブラリー調製が可能です。
- ❖ 必要なDNA量はNextera DNAキットでは 50ng、
Nextera XT DNA キットでは 1ng(定量方法はQubit/PicoGreen)
- ❖ Covarisによる断片化が不必要。
- ❖ マスターミックス試薬のため、試薬の分注が簡単。
- ❖ 多サンプル処理や、オートメーションも可能。

NexteraとNextera XTとの比較

| | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| Sample Input (必要DNA量) | Tagmentation (タグ付断片化) | Cleanup (Transposome の除去) | PCR (Index付加と増幅) | AMPure (必要なビーズ量) | Validation (ライブラリー の評価) |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|

Nextera DNA

| | | | | | |
|------|--|------|--|---|----------------------------------|
| 50ng | | Zymo | Nextera DNA index adapter; PCR: 5 cycles Tm: 63°C | 0.6x 0.5x: 2x250bp/ 2x300bp MiSeq | Qubit/PicoGreen + Bioanalyzer |
|------|--|------|--|---|----------------------------------|

Nextera XT

| | | | | | |
|-----|--|---------------------------------|--|---|---|
| 1ng | | Neutralize Tagment Buffer | Nextera XT index adapter; PCR: 12 cycles Tm: 55°C | < 300bp -> 1.8x < 500bp -> 1.8x > 500bp -> 0.6x -> 0.5x: 2x250bp 2x300bp MiSeq | <u>不要</u> Normalization Beads使用時 <u>PCR cleanup後:</u> Qubit/PicoGreen + Bioanalyzer (high-sensitivity Chip使用!) |
|-----|--|---------------------------------|--|---|---|

9

NexteraキットとNextera XTキットの相違(推奨)

| Nextera | Nextera XT |
|---|--|
| Large / complex genomes | Small genomes, amplicons, plasmids |
| Human genomes | PCR Amplicons (> 300 bp)* |
| non-human mammalian genomes (e.g. mouse, rat, bovine) | Plasmids |
| Plant genomes (e.g. arabidopsis, maize, rice) | Microbial Genomes (e.g. Prokaryotes, archea) |
| Invertebrates genomes (e.g. Drosophila) | Concatenated Amplicons |
| | double-stranded cDNA |

* Illumina recommends > 300 bp to ensure even coverage across the length of the DNA fragment. An expected drop off in sequencing coverage about 50 bp from each distal end of a fragment may be seen. This is because the tagmentation reaction cannot add an adapter right at the distal end of a fragment. For PCR amplicon sequencing this can be easily averted by simply designing your amplicons to be ~100 bases larger than the desired insert to be sequenced.

GTATCAATAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
ACTTACACACTTCTGTTAAGGHTAAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
CCTTGCACACCTGAGCAGCTTGTGTAACTTAAAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
CTTCTAAGCCTTAAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
CAAGCCTTAAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
ATAAGCCTTAAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT
GTATCAATAGATTAATTGATCCACTGATTCAGCCTAACGGANDTATCAATDAGACTAAATAATACGGTATCCATTAAGAGCCTGACGGTCCAGCAGCGAAGGAATGATAACGATACACACTCTCTTTAAGCCTTAAGCGAAGTATCACCTTAAGATTACT

Nextera XT DNA sample prepに必要なキット

▶ Nextera XT DNA Sample Prep kit

- 24 samples FC-131-1024
- 96 samples FC-131-1096

試薬類がパッケージ

▶ Nextera XT Index Kit

- 24 Indices, 96 samples FC-131-1001
- 96 Indices, 384 samples FC-131-1002

1サンプルを調製するだけの際も必要。
P5/P7領域、Index、Tag領域を含むプライマー

▶ Nextera XT v2 Index Kit

- 96 Indices, 384 samples (Set A-Dをすべて購入いただくと独立した384 インデックス)
(FC-131-2001/2002/2003/2004)

HiSeq V3とGA使用の場合は必要

▶ TruSeq Dual Index Sequencing Primers

- Single Read Run FC-121-1003
- Paired End Run PE-121-1003

シーケンサーで解析するためのシーケンスプライマー

Nextera DNA sample prepに必要なキット

- ▶ Nextera DNA Sample Prep kit
 - 24 samples FC-121-1030
 - 96 samples FC-121-1031

試薬類がパッケージ

- ▶ Nextera DNA Index Kit
 - 24 Indices, 96 samples FC-121-1011
 - 96 Indices, 384 samples FC-121-1012

1サンプルを調製するだけの際も必要。
P5/P7領域、Index、Tag領域を含むプライマー

HiSeq V3とGA使用の場合は必要

- ▶ TruSeq Dual Index Sequencing Primers
 - Single Read Run FC-121-1003
 - Paired End Run PE-121-1003

シーケンサーで解析するためのシーケンスプライマー

本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコルの取得方法。プロトコル上の注意

キットに使用するDNAサンプル(Input DNA)について

❖ プロトコール:

❖ 精製度の高い高品質なDNAを使用: 1ng (Nextera XT) / 50ng (Nextera)

❖ DNAは300bp以上(推奨1kb以上)、
短いDNAの場合はカバレッジが不均一になる可能性があります

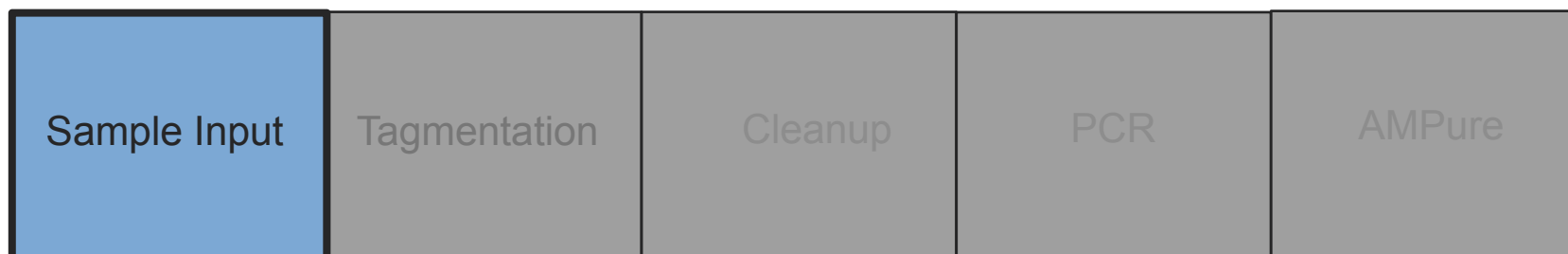
❖ 両端50~100bpのカバレッジは小さくなる傾向があります。

❖ 注意するポイント:

❖ 二本鎖DNA特異的な定量方法(例:Qubit/PicogreenあるいはQuantiFluor)

❖ Quality Checkはゲル泳動あるいは、 $A_{260/280}$ で測定(1.8-2の範囲)

❖ ピペットのキャリブレーションをしておく。



<https://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/life-science/laboratory-instruments/fluorometers/qubit.html>

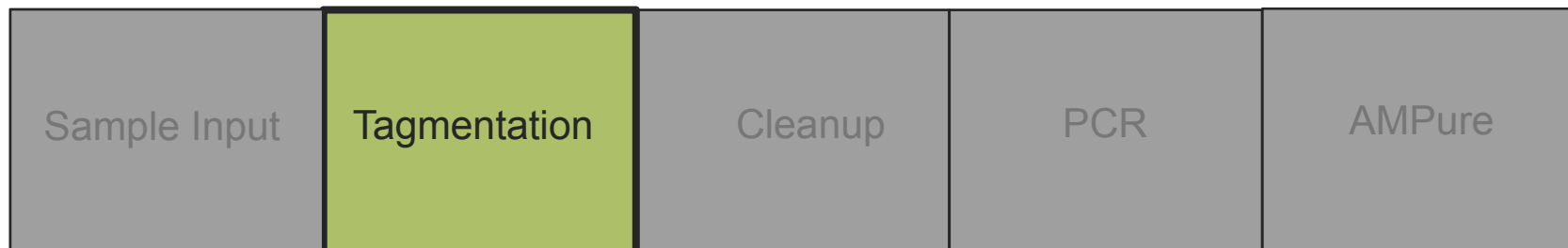
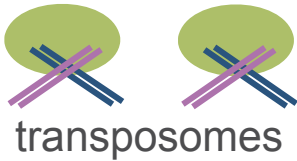
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/P11496>

http://www.promega.co.jp/Cre_Html.php?pGMPID=0526001

Tagmentation

❖ プロトコール:

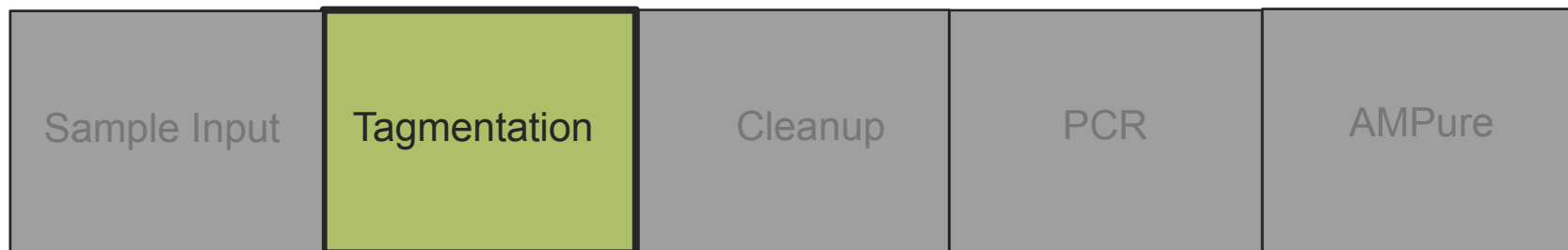
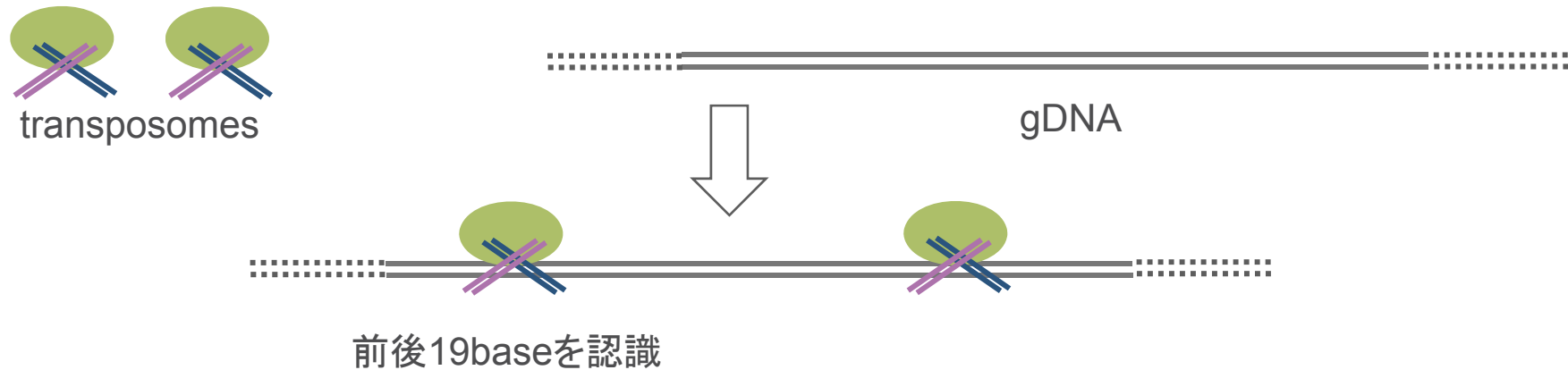
- ❖ **5 min at 55°Cの反応**
- ❖ XT DNA: 5uL DNA (at 0.2ng/uL) + 10uL Buffer + 5uL transposome = 20uL total
- ❖ DNA: 20uL DNA (at 2.5ng/uL) + 25uL Buffer + 5uL transposome = 50uL total



Tagmentation

❖ プロトコール:

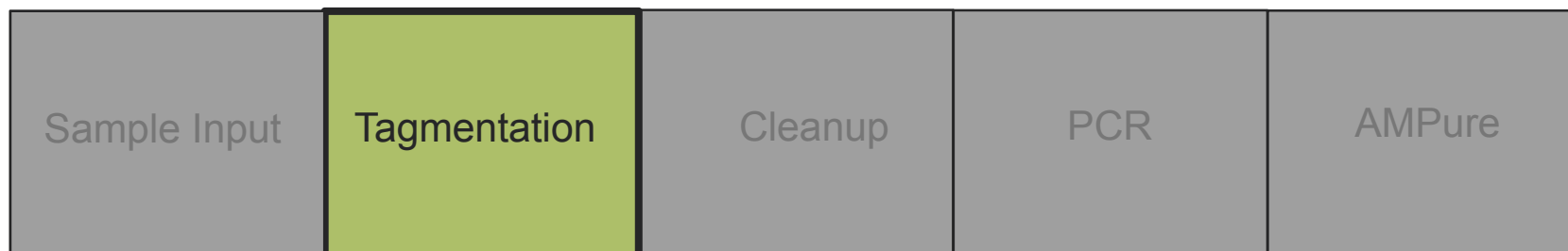
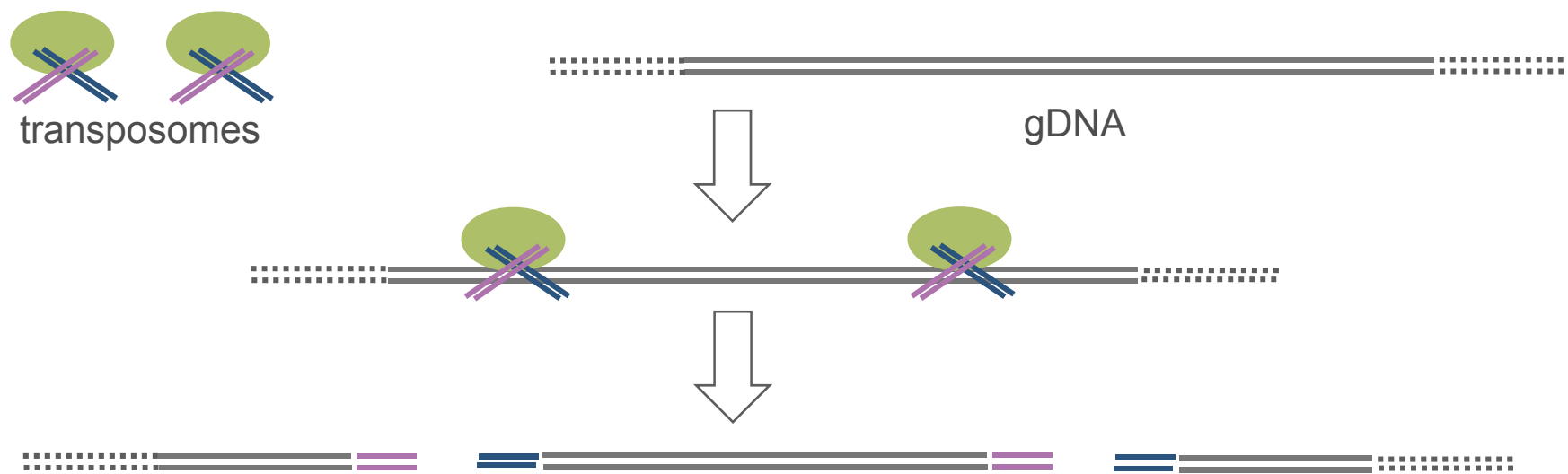
- ❖ **5 min at 55°Cの反応**
- ❖ XT DNA: 5uL DNA (at 0.2ng/uL) + 10uL Buffer + 5uL transposome = 20uL total
- ❖ DNA: 20uL DNA (at 2.5ng/uL) + 25uL Buffer + 5uL transposome = 50uL total



Tagmentation

❖ Protocol:

- ❖ 5 min at 55°Cの反応
- ❖ XT DNA: 5uL DNA (at 0.2ng/uL) + 10uL Buffer + 5uL transposome = 20uL total
- ❖ DNA: 20uL DNA (at 2.5ng/uL) + 25uL Buffer + 5uL transposome = 50uL total



Tagmentation

❖ Protocol:

❖ 5 min at 55°Cの反応

Nextera XT DNA: 5uL DNA (at 0.2ng/uL) + 10uL Buffer + 5uL transposome = 20uL total

Nextera DNA: 20uL DNA (at 2.5ng/uL) + 25uL Buffer + 5uL transposome = 50uL total

❖ Best Practices:

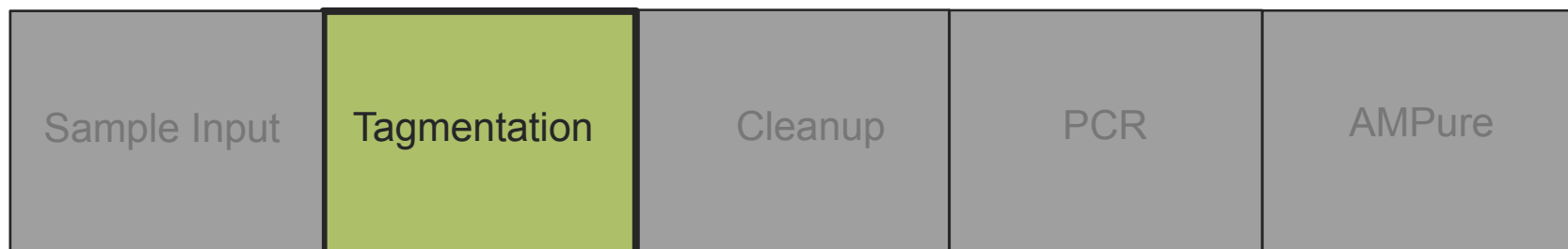
❖ 5分の反応の後には10°Cで保温。

注意！: トランスポソームは10°Cでも活性を残しtagmentationを続けます。

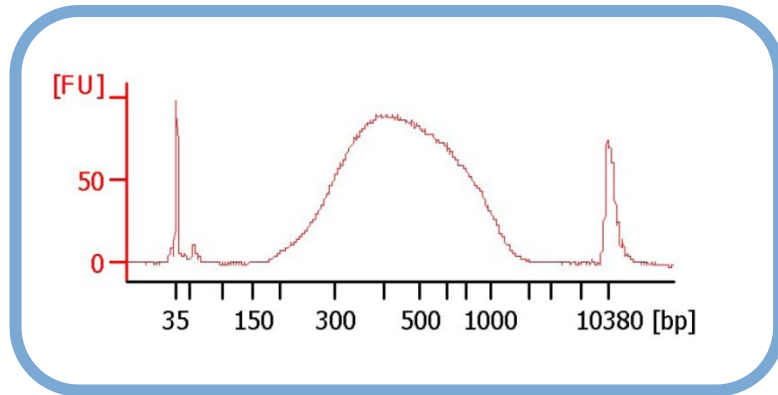
すぐに次のポイントに進む必要がある。

Nextera XTではNeutralize、NexteraではZymo cleanupでトランスポソームを失活除去します。

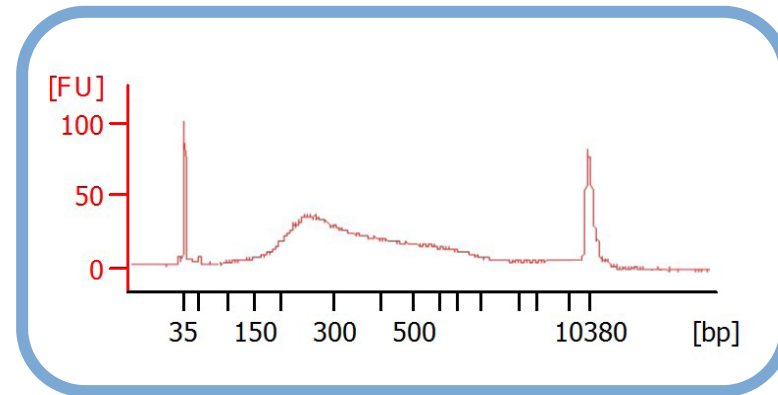
❖ PCR装置・ヒートブロックの温度が正確でない場合にtagmentationがうまく進まない/進みすぎることがある(その後の増幅工程にも影響)。設定を正確にする。



Overtagmentation (断片化されすぎ)

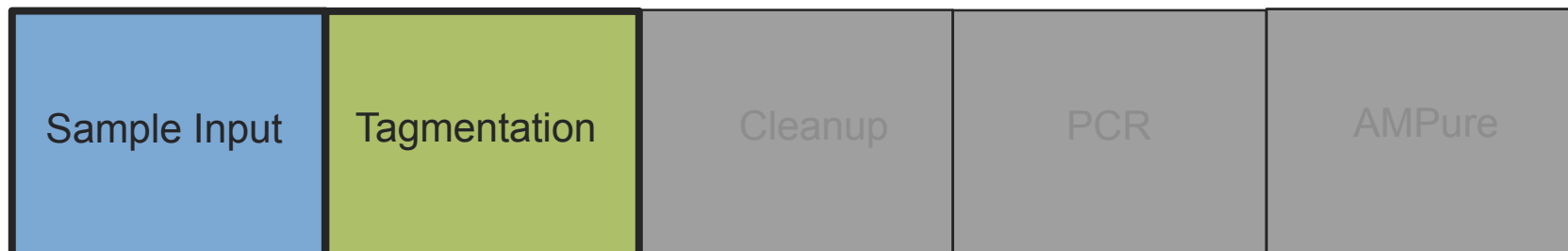


Input DNA = 50ng
最終ライブラリーサイズ分布

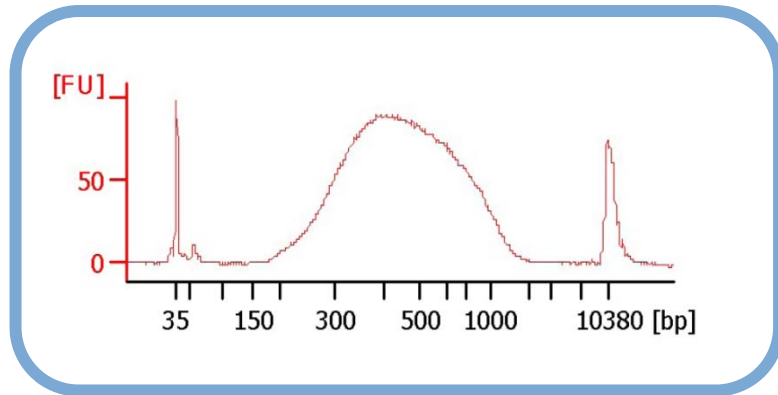


Input DNA < 50ng
最終ライブラリーサイズ分布

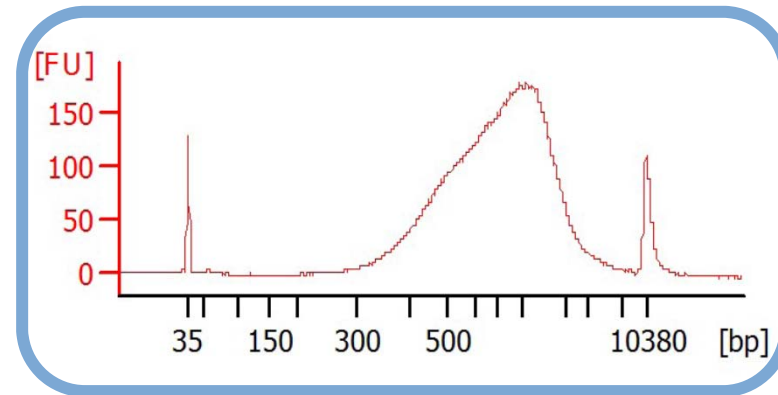
サンプル量が50ng (2.5ng/uL, Nextera)より少ないと
インサートサイズが小さくなる(=over-tagmentation)



Undertagmentation (断片化不十分)

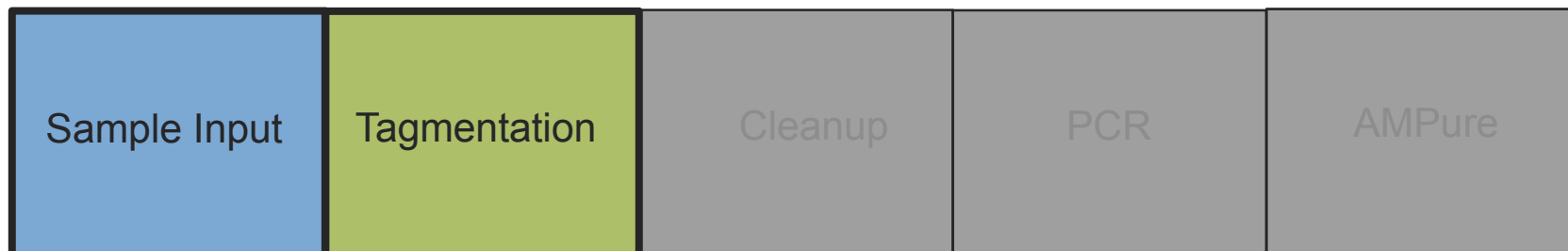


Input DNA = 50ng
最終ライブラリーサイズ分布



Input DNA > 50ng
最終ライブラリーサイズ分布

サンプル量が50ng (2.5ng/uL, Nextera)より多いと
インサートサイズが大きくなる(=under-tagmentation)



Quiz1

Quiz

- ▶ Tagmentation時にUndertagmentationになるようです。
 - 反応時間を長くしていいですか？

Ans1: No! プロトコールにできる限り従ってください。

- ▶ Undertagmentationが生じる場合、
まずは夾雑物のチェック、あるいは定量結果が正しいかを疑ってください。

プロトコールに比べて短い(長い)断片が欲しい場合は、
インプット量を調節して時間は変えない方向で調節ください。

Tagmentation: 夾雑物に気を付ける

- Input DNAは高精製、純水(milliQ)かTris buffer (10 mM PH8.5)に溶解されている。
- $A_{260:280}$ が 1.8-2.0 (Nanodropなどで)

| Carryover | Inhibitory Effect | Likely Source | Methods to minimize inhibition |
|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| EDTA | Chelation of metal ions | TE buffer | Reduce the concentration of EDTA to 0.1 mM in the TE buffer or simply use Tris-HCl (10 mM) or water to bring DNA in solution. |
| Alcohols | Enzyme precipitation and denaturation | Ethanol, isopropanol, isoamyl alcohol | Dry pellet and resuspend |
| Excess Salts | Template blocking | KCl, NaCl, CsCl, NaAc | Wash with 70% ethanol or use silica-based purification |
| Chaotropic salts | Enzyme denaturation | Guanidinium chloride; magnesium chloride; urea | Wash with 70% ethanol or use silica-based purification |
| Phenol:Chloroform | Enzyme denaturation | Organic carryover | Use PVP, PVP/ammonium acetate. Incorporation of 1.2% citric acid at the DNA extraction step |
| Polysaccharides | Template blocking | Dextrans, glycans | High salt precipitation, CTAB buffer, chloroform extraction, pectinase, cellulase, hemicellulase and/or α -amylase digestion |
| Protein | Template blocking | BSA, immunoglobins, PEG | Use SDS, CTAB or guanidinium buffers, proteinase K |
| Fat | Template blocking | Glycerol | Lipase or hexane treatment and chloroform extraction |
| Detergents / DDT | Enzyme precipitation and denaturation | Sodium deoxycholate, sarkosyl, SDS, Nonidet P-40, Tween 20, Triton X-100, N-octyl glucoside | Wash with 70% ethanol |
| Proteases | Protein degradation | Proteinase K, sample handling | Phenol:chloroform extraction followed by EtOH precipitation |
| Nucleases | Template degradation | Sample handling, restriction enzymes, micrococcal nuclease, S1 | Use B-ME, EGTA or SDS during protein precipitation |
| Exogenous DNA / RNA | Template competition | Carryover | DNase I for DNA removal; RNase A for RNA, RNA:DNA hybrid removal |
| Carriers | Template competition and/or blocking | RNA, heparin, glycogen | Only use carriers that do not serve as template or block the template such as linear acrylamide, N- or P-carriers |
| Agarose | Template blocking | Gel extractions | Use a spic column with chaotropic salt buffer; dialysis |
| Excess metal ions | Reduce oligo specificity | Mg ⁺⁺ from PCR buffer | Dialysis against PBS (pH 7.4), phenol:chloroform extraction followed by EtOH precipitation |

<https://icom.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/QqttpskaC0ywyI9co83qXg/considerations-for-dna-isolation-when-using-nexter>

Cleanup

❖ Protocol:

❖ カラム精製(Nextera)/中和反応 (Nextera XT)でtagmentation反応を止めPCR増幅前にDNA断片を精製する。

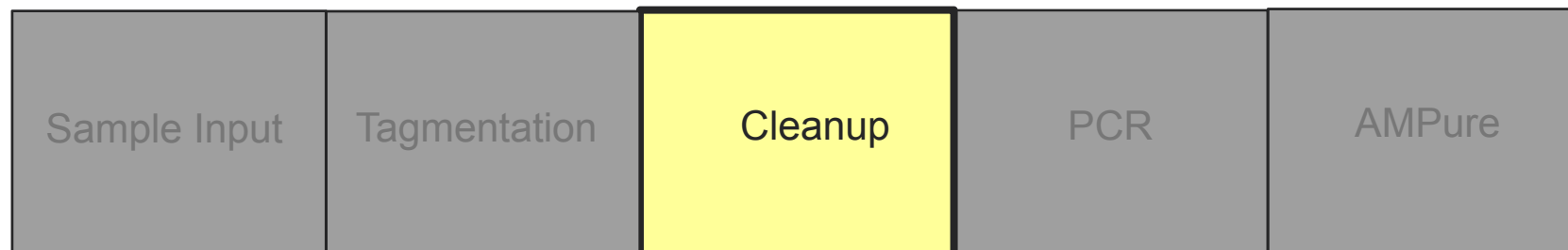
❖ 溶出液20uLを次のPCRステップに使用する。

❖ Best Practices:

❖ ウォッシュバッファーは用事調製したエタノール溶液を使用。
❖ エタノール濃度が適正でないとTransposomeがのぞけない。
PCR増幅がうまくかからない。

❖ Bioanalyzer (1uLアプライ)で溶出液は150bp~1.5kbにピークを示します。

❖ 遠心強度(1300xg)を厳守します。(収量を減らす可能性があります)



PCR増幅

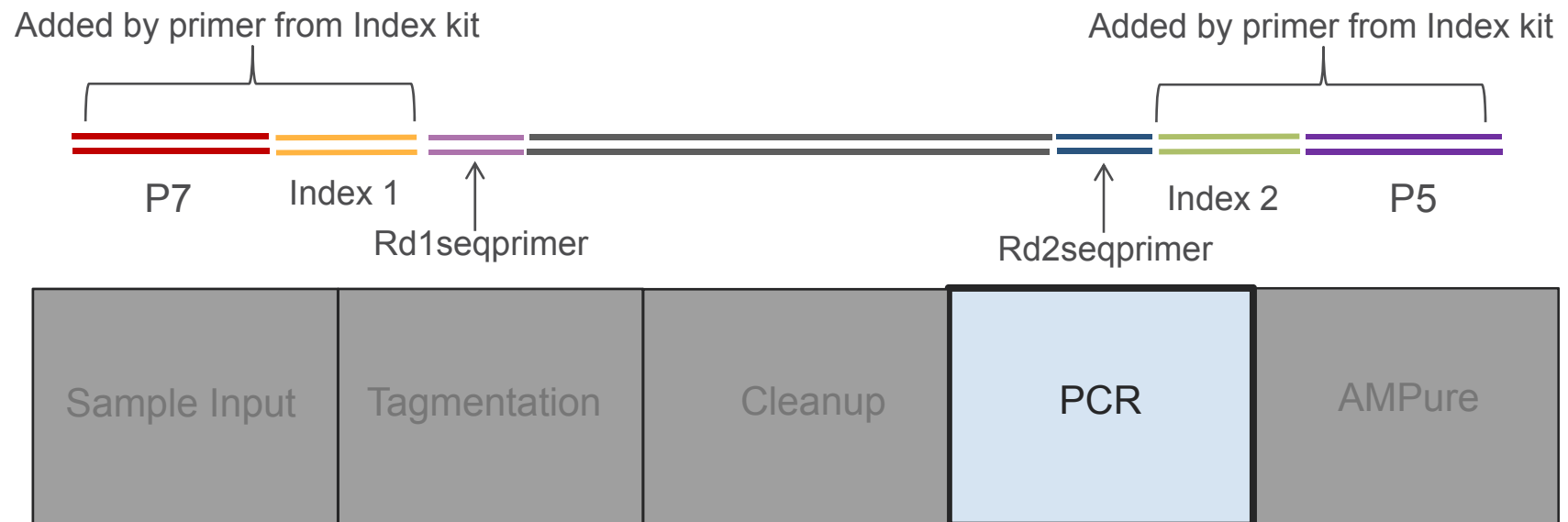
❖ Protocol:

❖ 4つのプライマーで行う5 cycle (Nextera)/12 cycle (Nextera XT)のPCR反応。

❖ 2つの indexプライマーを添加！（プーリングしなくても）

❖ IndexキットのプライマーにはP5/P7（フローセルに結合する部分）がついているので必ず必要な作業。

❖ PCR Mix (PPC and NPM)にもP5/P7配列を含むプライマーが入っており 全体のライブラリーを増幅する。



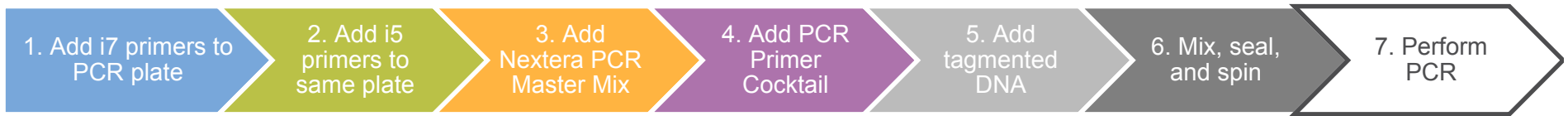
PCR増幅



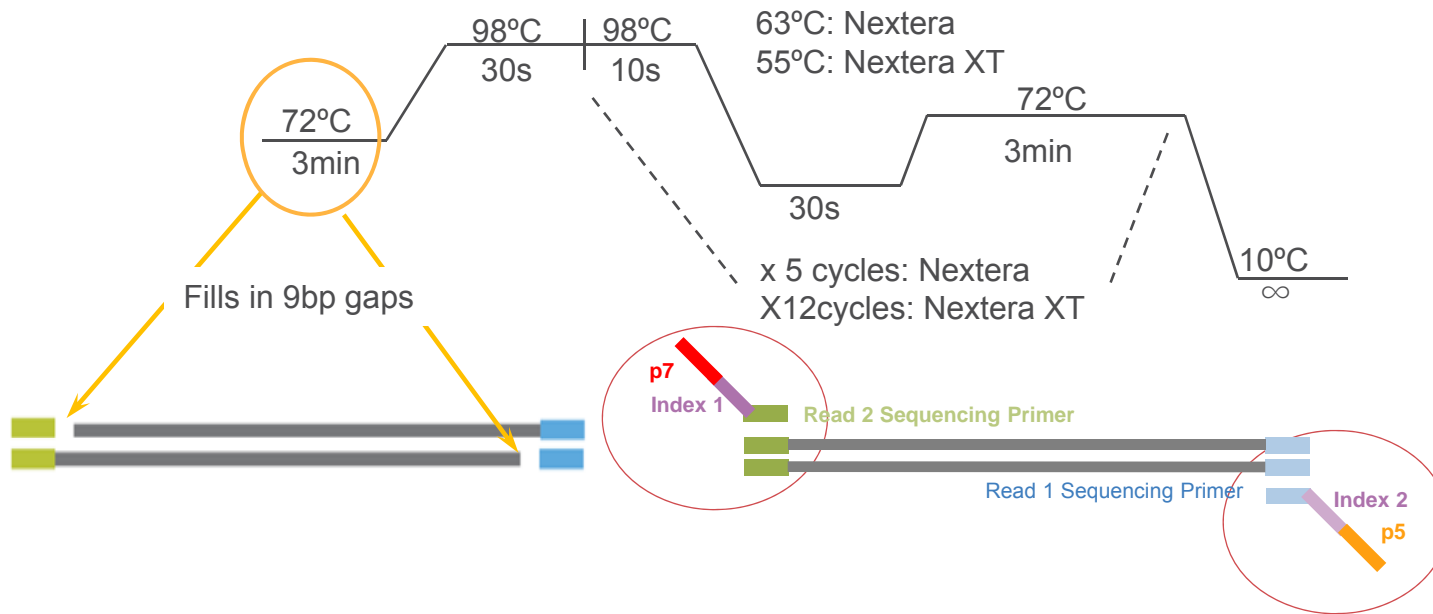
- ▶ Indexプライマーには2種類のインデックスが付属しており計96/384種類の組み合わせ可能。
 - 独立した96種類のバーコード化が可能
20 チューブのみ (12 Index 1 x 8 Index 2)
 - Plate Fixtureでハンドリングが安心
 - MiSeq Reporter/bcl2fastq/CASAVAで振り分けまでサポート
- ▶ Illumina Experiment Managerでサンプルシートを作成。
 - インデックスの組み合わせもチェック可能。
(~IEM1.6に限られます)



PCR増幅



P5/P7配列を負荷するためインデックスを読まない場合でもNextera Index Kitが必要です！



PCR増幅

❖ プロトコール:

❖ 4つのプライマーで行う 5 cycle (Nextera)/12 cycle (Nextera XT)のPCR反応。

❖ 2つの indexプライマーを添加！（インデックスを読まなくても必要です）

❖ IndexキットのプライマーにはP5/P7（フローセルに結合する部分）がついているので必ず必要な作業。

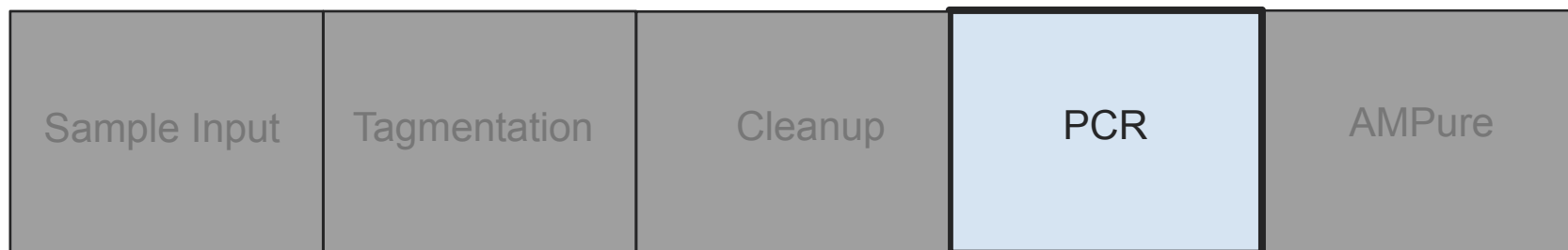
❖ PCR Mix (PPC and NPM)にもP5/P7配列を含むプライマーが入っており 全体のライブラリーを増幅する。

❖ Best Practices

❖ ヒートリッド付きのPCR装置を使用してください。

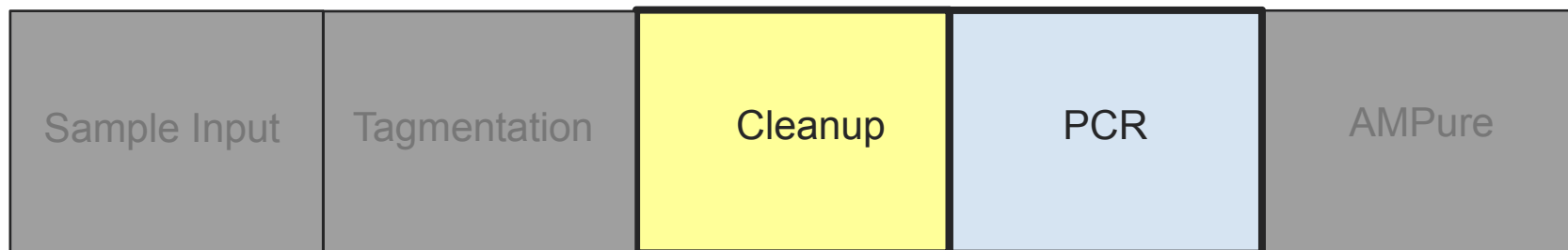
❖ その他のPCR装置では収量が悪くなる可能性があります。

❖ PCR装置の温度調整が正確かを確認ください。



CleanupとPCR

- ❖ PCR後にはアダプターが付加するため68bp長さが大きくなる。
- ❖ トランスポゾーム中にアダプターの一部の配列が含まれるため (tagの部分)、アダプターダイマーはTruSeqタイプよりも短くなる。
- ❖ Zymo clean-up (Nextera)またはNeutralization反応(Nextera XT)が適正に行われていない場合は、ライブラリーの収量が少なく(あるいは完全に消失)なり、55-60bpのPCR プライマーダイマーが生じる可能性があります。



Quiz2

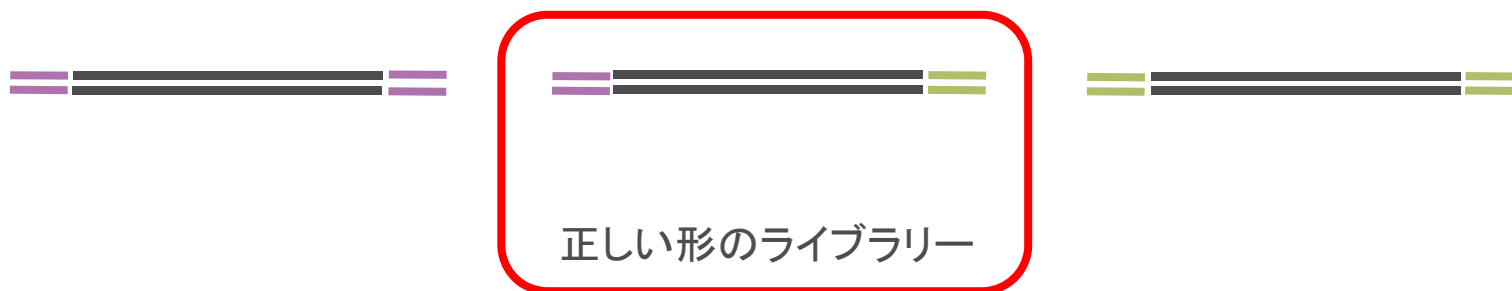
Quiz

- ▶ Kitで所定のサイクル数では収量が確保できません。
 - サイクル数を上げて収量を多くしてもいいですか？

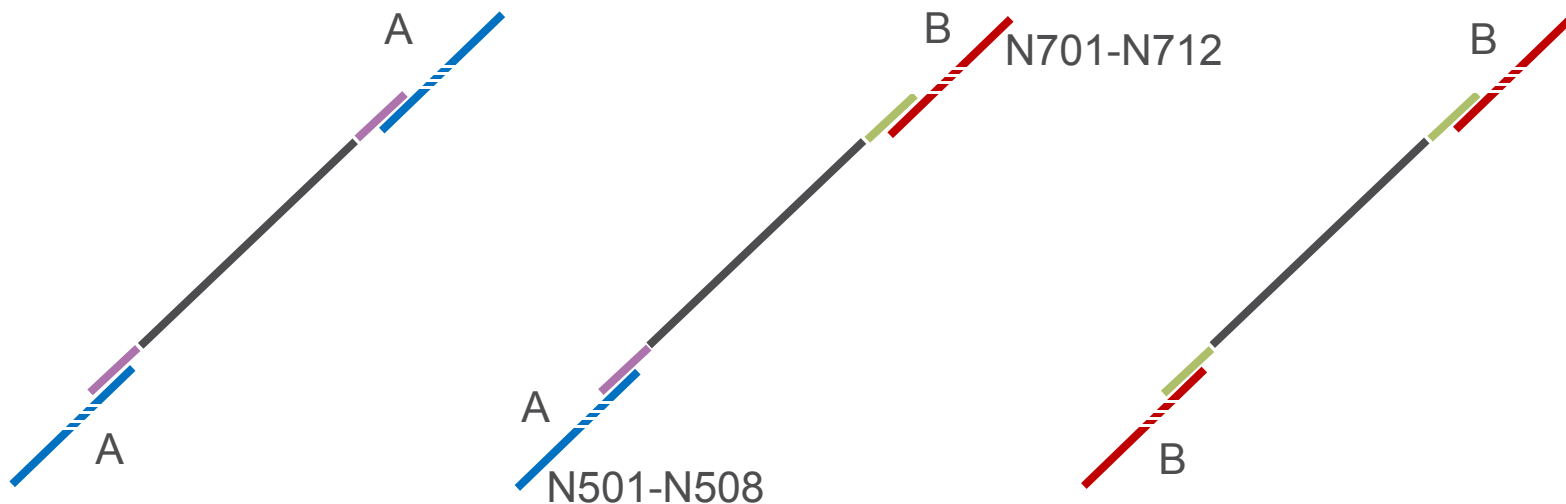


Ans2: No!

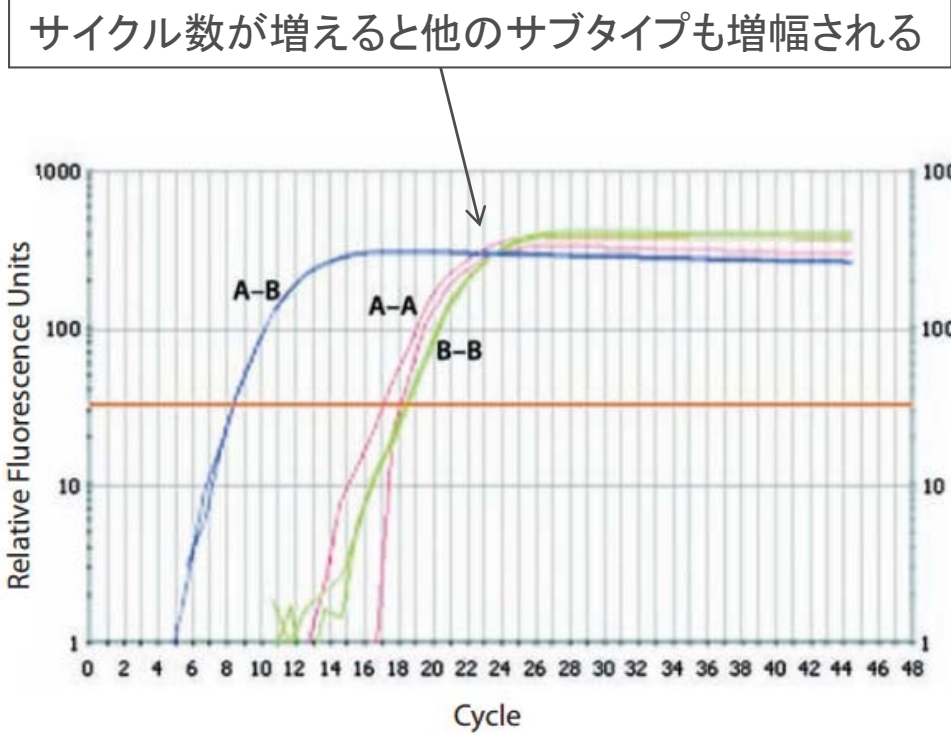
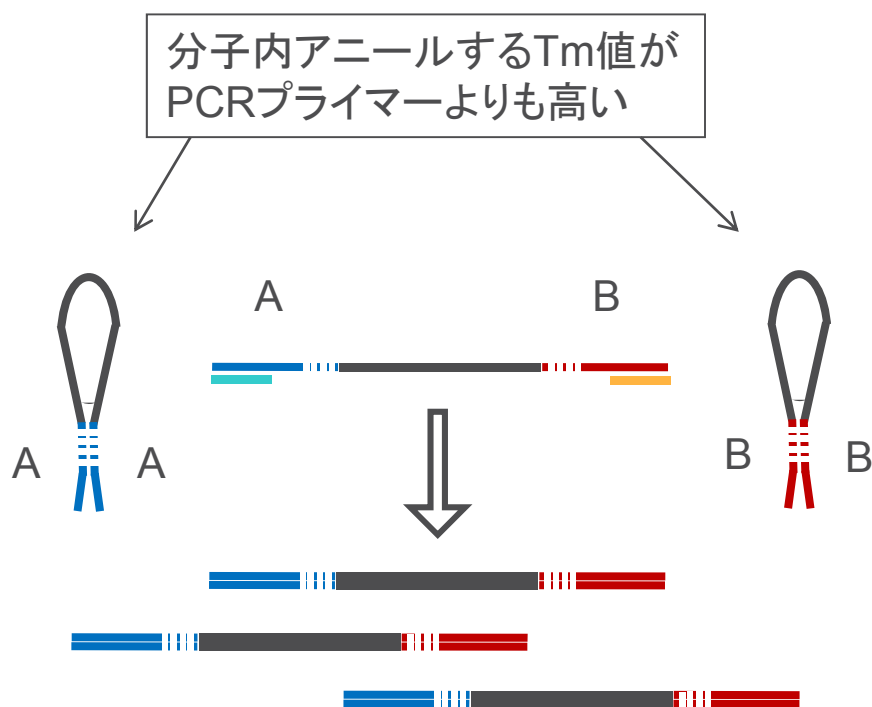
Tagmentation後には3種類のプロダクトができている。



それぞれを鋳型にしたPCR反応でも3つのプロダクトが産生される可能性がある。



小さいサイクル数だと両端に異なるアダプターを持つものが優先的に増幅される



結論: PCRのサイクル数は収量が悪い場合でも変えないでください!

<http://www.epibio.com/docs/default-source/forum-archive/forum-16-3---nextera-technology-for-ngs-dna-library-preparation---simultaneous-fragmentation-and-tagging-by-in-vitro-transposition.pdf?sfvrsn=4>

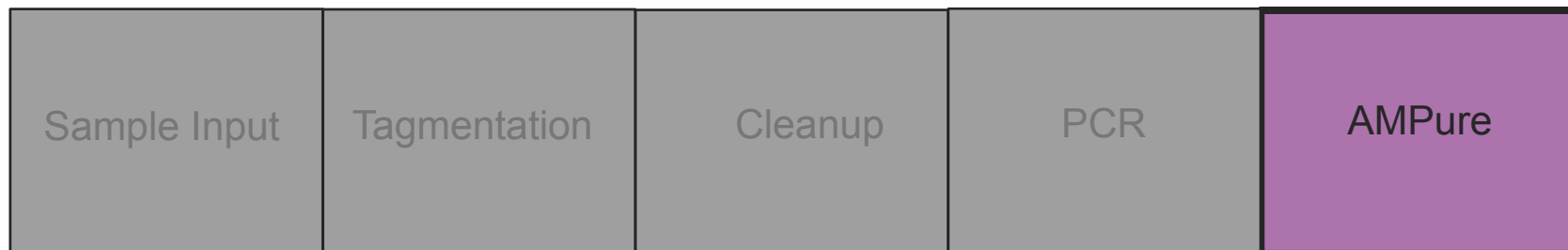
AMPure Clean-up

❖ Protocol:

- ❖ 50uL sample + 30uL AMPure beads
25uL AMPure beads (Nextera DNAで2x250bpか2x300bpのMiSeqラン)
- ❖ Nextera XTのビーズ精製はサイズによって異なるので注意。
- ❖ **Magnetic stand = Ambion, part #AM10027**

❖ Best Practices:

- ❖ 用事調製した80%エタノール溶液を使用。
古いエタノールを使用するとウォッシュの効率および収量が悪くなる。
- ❖ ビーズの容量を守る(回収されるサイズが変わるため)
チップの中に泡やつまりなどがないようにチェック
- ❖ チップの中にビーズが残らないようにピペティングを丁寧に行う。
- ❖ プロトコールで指定されたMagnetic standを使用する。(ビーズのロス・キャリーオーバーをなくすため)



本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

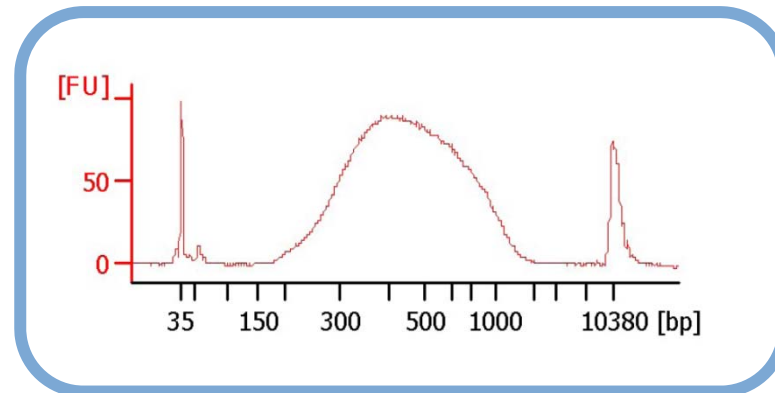
- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコールの取得方法。プロトコール上の注意

Library定量

- ❖ 二本鎖DNA特異的な定量方法(例:PicogreenとQubitあるいはQuantiFluor)を使用。
- ❖ 下記のようなトレースであったら(400-500bpにピークがあるが250-1000bpにブロード),
1ng/uL=3nM conversion factorで濃度換算する。

Example:



サンプルがQubit で12ng/uL
であったら、

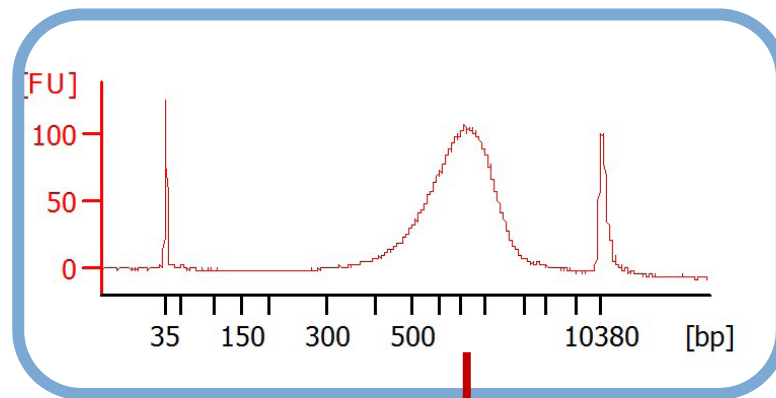
$$\frac{12\text{ng/uL}}{1\text{ng/uL}} \times \frac{3\text{nM}}{1\text{ng/uL}} = \text{終濃度}36\text{nM}$$

Library定量

❖ 下記のようなトレースであったら(400-500bpにピークがあるが250-1000bpにブロード),
1ng/uL=3nM conversion factorで濃度換算する。

$$1\text{ng/uL}=3\text{nM} / (\text{library average size in bp} / 500\text{bp})$$

Example:



サンプルがQubit で12ng/uL
であったら、

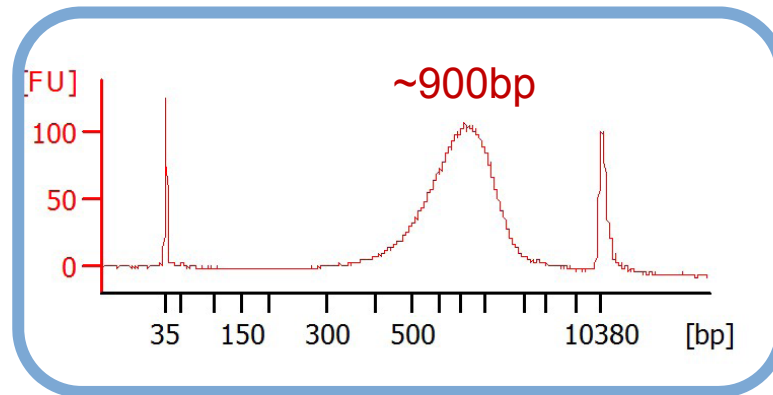
平均ライブラリーサイズが900bp

Library定量

❖ 下記のようなトレースであったら(400-500bpにピークがあるが250-1000bpにブロード),
1ng/uL=3nM conversion factorで濃度換算する。

$$1\text{ng/uL} = 3\text{nM} / \left(\frac{\text{library average size in bp}}{500\text{bp}} \right)$$

Example:



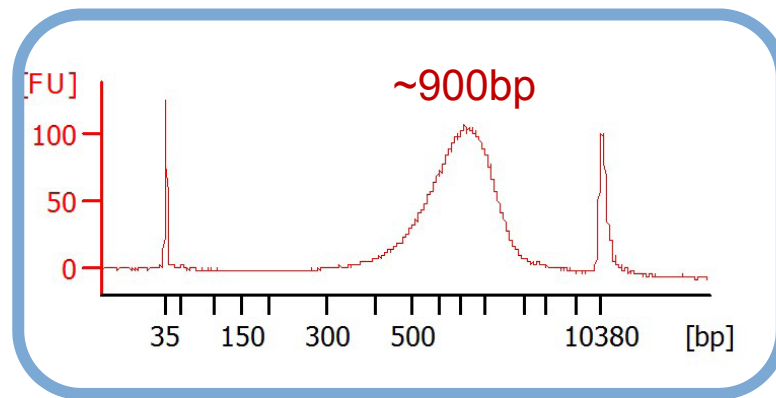
サンプルがQubit で12ng/uL
であったら、

$$\frac{1\text{ng/uL}}{\quad} = \frac{3\text{nM}}{(900/500)} = 1.67\text{nM conversion factor}$$

Library定量

$$\frac{1\text{ng/uL}}{\quad} = \frac{3\text{nM}}{(900/500)} = 1.67\text{nM conversion factor}$$

Example:



サンプルがQubit で12ng/uL
であったら、

$$\frac{12\text{ng/uL}}{\quad} \times \frac{1.67\text{nM}}{1\text{ng/uL}} = \text{終濃度}20\text{nM}$$

Library定量: Technical Noteを参照ください

Technical Note: DNA Sequencing illumina®

Nextera® Library Validation and Cluster Density Optimization

Guidelines for generating high-quality data with Nextera sample preparation kits.

Introduction

Each kit in the Nextera family of sample preparation (DNA, XT DNA, Custom Enrichment, and Exome Enrichment) requires different considerations for final library validation and optimization of cluster density. Because each Nextera protocol is designed for a distinct application, it is important to tailor the library validation and clustering processes to each specific Nextera kit.

The Nextera "tagmentation" reaction simultaneously fragments and tags DNA with adapters. As with other enzymatic fragmentation protocols, the amount of input DNA can affect the outcome of the assay. Using too little DNA may result in libraries with shorter insert sizes, and conversely using too much DNA will result in libraries with larger insert sizes. This technical note describes best practices for optimizing the final libraries generated with each Nextera kit.

Starting Material

Nextera kits are ideal for high-throughput studies, providing fast sample preparation methods with low input requirements. Nextera DNA and Enrichment protocols are optimized for 50 ng of high-quality genomic DNA, and the Nextera XT DNA kit requires 1 ng of small genome or amplicon DNA. To ensure that nucleic acids aside from double-stranded DNA do not interfere with quantitation, Qubit² or PicoGreen² assays are recommended to quantify the input genomic DNA. To ensure accuracy, Illumina recommends quantifying a concentrated solution of each sample and subsequently diluting to the input concentration specified in each sample preparation user guide.

Organic contaminants (including ethanol) have been shown to interfere with the Nextera tagmentation reaction, and should be eliminated from the input DNA prior to quantitation using standard methods. EDTA in DNA elution or dilution buffers can also interfere with the tagmentation reaction, and should be avoided.

Figure 1: Distribution of Final Library Sizes

A

B

The final library traces for Nextera DNA libraries were generated using a BioAnalyzer. These example size distributions are also applicable to Nextera XT libraries that have not been normalized. To optimize clustering concentrations based on average library size of 500 bp, the sample shown in Panel A requires the conversion factor 1 ng/μL = 3 nM. Clustering concentrations for the sample shown in Panel B should be converted using the equation 1 ng/μL = 1.5 nM, based on an average library size of 1 Kb.

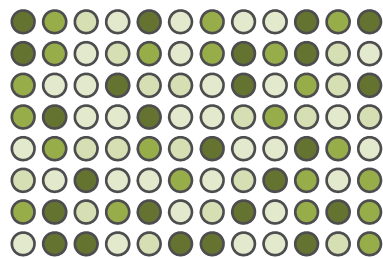
平均サイズ500b
1ng/uL=3nM

平均サイズ1kb
1ng/uL=1.5nM

http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_nextera_library_validation.pdf

**NexteraXTキットの場合は、
Normalization beadsにより濃度調整できる(多数サンプル解析向け)。
qPCRに持ち込まずすぐにMiSeqへ！**

濃度が異なるライブラリー



qPCRで定量
(Triplicate)

希釈率を計算

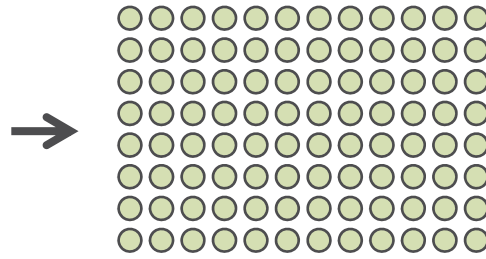
マニュアル作業
で希釈とサンプ
ルのプール

Index CV for
20-sample pools

| Pool A | Pool B |
|--------|--------|
| 15.8% | 18.2% |



Normalization
beadsで処理:
Bind, Wash,
Elute



5 µlずつのライブラリーをプールして直接アプライ！



| | |
|-------|-------|
| 13.5% | 15.5% |
|-------|-------|

**Nextera XTを使えばサンプルの変性ステップを省略可能！
(少量サンプルの場合、マニュアルで変性希釈することも可能です)**

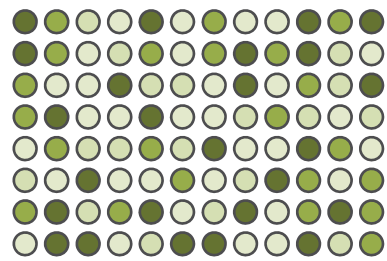
Quiz3

Quiz

- ▶ Nextera XTライブラリーをQubitで計測したら収量が小さすぎます。
– どこかハンドリングが悪いのでしょうか？

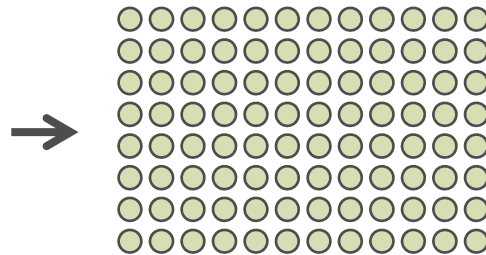
Ans3: 正常です。

濃度が異なるライブラリー



Index CV for
20-sample pools

| Pool A | Pool B |
|--------|--------|
| 15.8% | 18.2% |
| 13.5% | 15.5% |



5 μlずつのライブラリーをプールして直接アプライ!



Nextera XT kitでは、ライブラリーがNormalization beadsからの溶出時にNaOHで変性されます。したがって、得られるライブラリーはssDNAとなりQubitで測れません。

結論: Nextera XTライブラリーは最終産物を定量しないプロトコールになります。ただ、最初の実験の場合など定量する必要がある場合はqPCRをご使用ください。あるいは、Normalization beadsを使用せず変性+プールください。

本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコルの取得方法。プロトコル上の注意

Indexの読み合わせ (NextSeq500を除くイルミナNGS)

POOLING GUIDELINES:

- 1サイクルで緑蛍光・赤蛍光がそれぞれ1色ずつ必要 (緑蛍光= G/T;赤蛍光= A/C)
- Pooling ≤ 6 samples: シングルインデックスでかける
- Pooling > 6: シングルかデュアルかどちらかでかけるが組合せを意識する。
- MiSeq Control Software 2.2/HiSeq Control Software2.2.38以上ではバランスの悪いインデックスでも可能だが、一部の視野でオーバークラスターになるのを避けるため塩基はバランスを考慮したほうがクオリティーが良くなります。

| Good | | | | Bad | | | |
|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| Index 1 | | Index 2 | | Index 1 | | Index 2 | |
| 705 | GGACTCCT | 503 | TATCCTCT | 705 | GGACTCCT | 502 | CTCTCTAI |
| 706 | TAGGCATG | 503 | TATCCTCT | 706 | TAGGCATG | 502 | CTCTCTAI |
| 701 | TAAGGCGA | 504 | AGAGTAGA | 701 | TAAGGCGA | 503 | TATCCTCT |
| 702 | CGTACTAG | 504 | AGAGTAGA | 702 | CGTACTAG | 503 | TATCCTCT |
| | √√√√√√√√ | | √√√√√√√√ | | √√√√√√√√ | | √√√√xxxx |

√=signal in both color
x=signal missing in one color channel



Quiz4

Quiz

- ▶ TruSeqライブラリーとNexteraライブラリーを混ぜて(プールして)解析したいです。可能でしょうか？



Ans4: できれば別なレーンで流してください。

NexteraライブラリーはTruSeqライブラリーと
同時に解析できますか？:



同じレーン: No!

弊社では異なる種類のライブラリーを同じレーンで解析することをお勧めしていません。

- ライブラリーの長さが異なるとクラスターの径が異なりFWHMが不安定。クォリティーに影響を与える。
- Indexの組み合わせをチェックする必要あり。



同じフローセル: Yes!

インデックスの振り分けのパイプラインはご用意ください。

[まとめ] NexteraとNextera XTとの比較

| | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| Sample Input (必要DNA量) | Tagmentation (タグ付断片化) | Cleanup (Transposome の除去) | PCR (Index付加と増幅) | AMPure (必要なビーズ量) | Validation (ライブラリー の評価) |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|

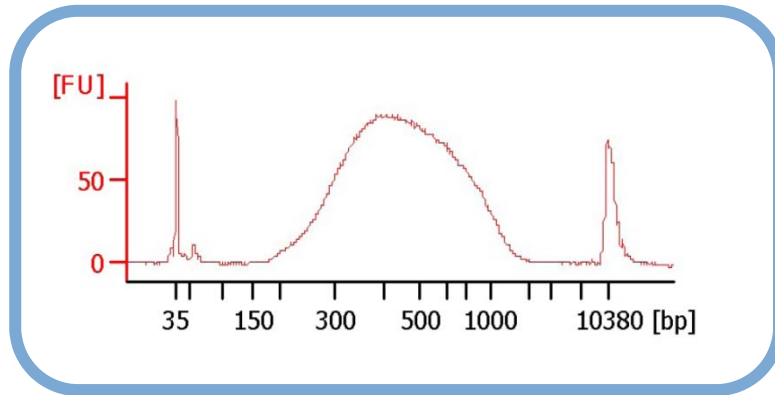
Nextera DNA

| | | | | | |
|------|--|------|--|---|----------------------------------|
| 50ng | | Zymo | Nextera DNA index adapter; PCR: 5 cycles Tm: 63°C | 0.6x 0.5x: 2x250bp/ 2x300bp MiSeq | Qubit/PicoGreen + Bioanalyzer |
|------|--|------|--|---|----------------------------------|

Nextera XT

| | | | | | |
|-----|--|---------------------------------|--|---|---|
| 1ng | | Neutralize Tagment Buffer | Nextera XT index adapter; PCR: 12 cycles Tm: 55°C | < 300bp -> 1.8x < 500bp -> 1.8x > 500bp -> 0.6x -> 0.5x: 2x250bp 2x300bp MiSeq | <u>不要</u> Normalization Beads使用時 <u>PCR cleanup後:</u> Qubit/PicoGreen + Bioanalyzer (high-sensitivity Chip使用!) |
|-----|--|---------------------------------|--|---|---|

[まとめ] 最終ライブラリーQuality Check



☆ トラブルシューティング対象ステップ

| | Input | Tagmentation | Cleanup | PCR | AMPure | 原因 |
|---------------------|-------|--------------|---------|-----|--------|---|
| ピーク無し | | | | | ☆ | AMPure精製時にすべてのサンプルを失っている。 |
| 55bpのみピーク | | | ☆ | | | プライマーのみみられるので、PCRに持ち込む前のステップでサンプルをロスしている。 |
| サンプルのピークの他に55bpのピーク | ☆ | | | ☆ | | インプット量を確認(正確に定量)。ピペッティングを正確に。 |
| ピークが高すぎる・低すぎる | ☆ | ☆ | | | | インプット量を確認(正確に定量)。Tagmentation時の条件を再確認。ヒートブロックの調整。 |

本日のウェビナーの内容

- ▶ キットの特色・ワークフローのご紹介

- 注意すべきポイントとして途中でよくいただくお問い合わせにつきましてQuizとしてご案内させていただきます。

- ▶ ライブラリーの定量・濃度変換について

- ▶ シーケンサーにかける前に注意すること

- ▶ プロトコルの取得方法。プロトコル上の注意

ご使用前には説明書をご用意ください

- ▶ 2つの説明書があります。製品のサポートページでダウンロードできます。
 - Nextera DNA: http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_dna_kit.html
 - Nextera XT: http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_xt_dna_kit.html
- ▶ Userguide: 細かい手順をご案内した資料。取扱説明書。
 - Nextera DNA
http://support.illumina.com/downloads/nextera_dna_sample_preparation_guide_15027987.html
 - Nextera XT
http://support.illumina.com/downloads/nextera_xt_sample_preparation_guide_15031942.html
- ▶ Experienced User Card: ベンチ横に置くプロトコール
 - Nextera DNA
http://support.illumina.com/downloads/nextera_dna_sample_preparation_euc_15028285.html
 - Nextera XT
http://support.illumina.com/downloads/nextera_xt_sample_preparation_experienced_user_card_15031943.html

その他の資料を参照ください

- ▶ Lab Tracking Form: 使用した試薬のLotなどを記録する用紙
 - Nextera DNA
http://support.illumina.com/downloads/nextera_dna_sample_preparation_lab_tracking_form_15028288.html
 - Nextera XT
http://support.illumina.com/downloads/nextera_xt_sample_preparation_lab_tracking_form_15031944.html
- ▶ 必要な消耗品・装置類のリストはユーザーガイドの最後に”Consumables and Equipment”として掲載しております。

Consumables and Equipment

Check to make sure that you have all of the necessary user-supplied consumables and equipment before proceeding to library preparation. These consumables and equipment are Illumina recommended for the Nextera XT DNA Library Preparation protocols.

Table 3 User-Supplied Consumables

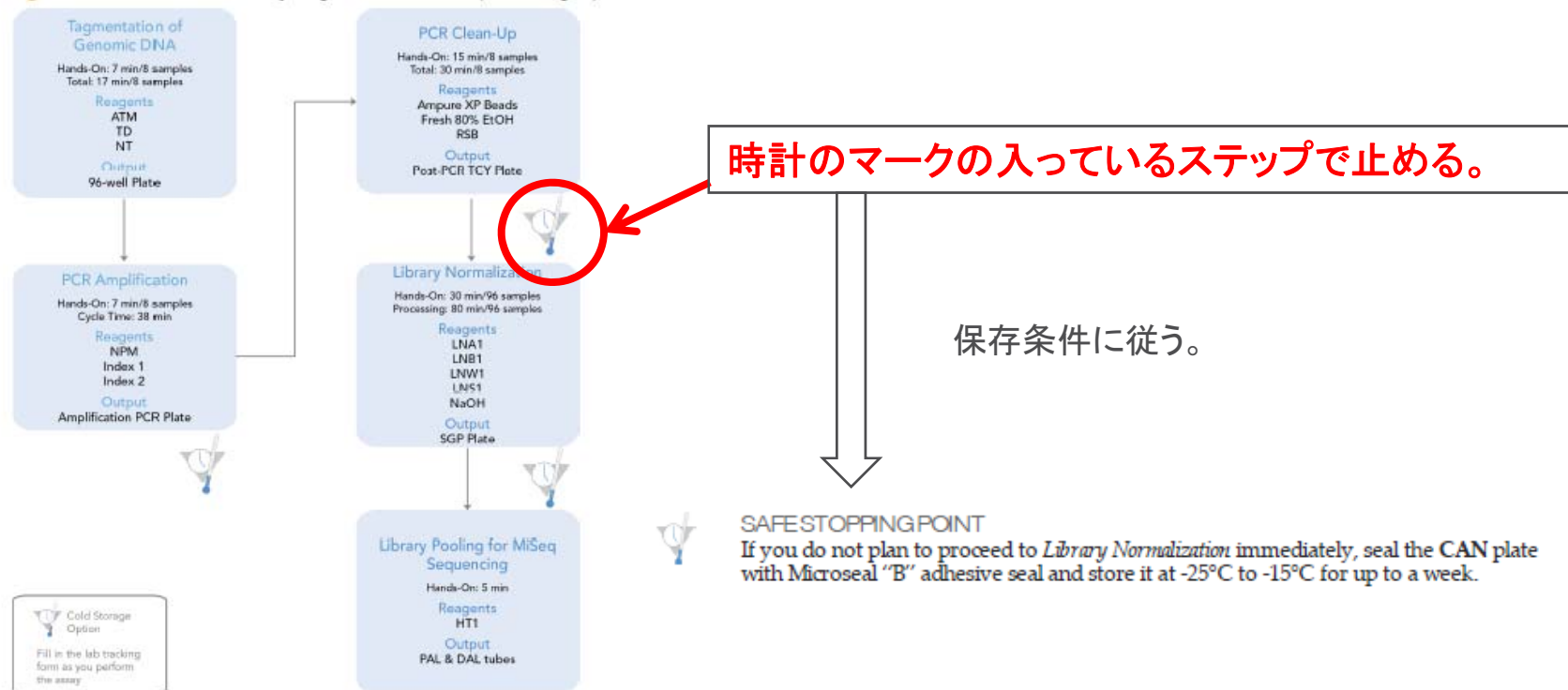
| Consumable | Supplier |
|-------------------------------|----------------------|
| 10 µl pipette tips | General lab supplier |
| 10 µl multichannel pipettes | General lab supplier |
| 10 µl single channel pipettes | General lab supplier |
| 1000 µl pipette tips | General lab supplier |
| 1000 µl multichannel pipettes | General lab supplier |

中断できるステップを確認ください

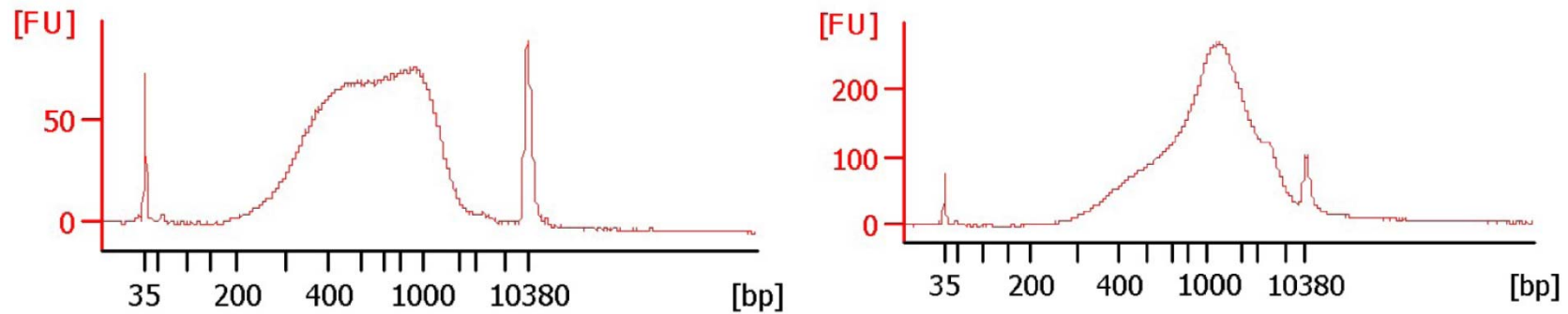
Nextera XT DNA Library Preparation Workflow

The following diagram illustrates the workflow using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit. Safe stopping points are marked between steps.

Figure 1 Nextera XT DNA Library Preparation Workflow (For 8 samples)



弊社のサポートページには種々の情報が掲載されております。
ご利用ください。



Technical Notes:

[Nextera Library Validation and Cluster Density Optimization](#)

[Nextera Low Plex Pooling Guidelines](#)

Support Bulletins:

[Nextera Bioanalyzer traces and sequenced insert size: a comparison](#)

[Considerations for DNA isolation when using Nextera kits](#)

[Decreasing DNA input amount leads to shorter inserts for Nextera DNA Libraries](#)

[Pool up to 384 Samples with Nextera XT](#)

[Nextera Tagmentation Troubleshooting](#)

[New Online Troubleshooting Tools for Nextera DNA and TruSeq DNA PCR-Free](#)

[Sample Prep Kits](#)



ご清聴ありがとうございました。
しばらくご質問を承ります。