



本日のウェビナーの内容

- ▶ キットのラインナップのご紹介→今回ご案内するキット
- ▶ TruSeq DNAキット (PCR-free, Nano, ChIP)
- ▶ TruSeq RNAキット (RNA V2, Stranded mRNA/Total RNA)
- ▶ TruSeq DNAとTruSeq RNAで共通のポイント
- ▶ ライブラリーの評価: Bioanalyzerのデータ
- ▶ 弊社ウェブ上のサポートツールのご案内

TruSeqシリーズ、ラインナップ (2015年3月現在)

これまで開催いたしましたウェビナーのご紹介

http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn

以前のウェビナー参照ください

DNAキット

- TruSeq DNA PCR-Free
- TruSeq Nano DNA
- TruSeq ChIP
- TruSeq Synthetic Long-Reads
- TruSeq Custom Amplicon, TruSeq Cancer Panel

2013/02/15
サポートウェビナーシリーズ 2013
TruSeq DNA, TruSeq PCR Free Protocolのご紹介
イルミナ株式会社 シニア テクニカル アプリケーション サイエンティスト
酒井名朋子

2014/11/28
イルミナ NGSでロングリードを可能にするTruSeq Synthetic Long-Readライブラリー調製キット:ワークフローのご紹介および注意点
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
崎川真里

2012/02/23
製品のご紹介
TruSeqカスタムアンプリコン - DesignStudioを用いたプローブデザインと実験ワークフロー
イルミナ株式会社 シーケンススペシャリスト
鈴木 健介

RNAキット

- TruSeq RNA V2
- TruSeq Stranded mRNA
- TruSeq Stranded total RNA
- TruSeq Small RNA
- TruSeq Targeted RNA
- TruSeq RNA Access

2012/04/17
製品のご紹介
TruSeq Amplicon Cancer Panel - 48の癌関連遺伝子をターゲットとするディープシーケン
イルミナ株式会社 シーケンススペシャリスト
鈴木 健介

2014/04/18
NGSをはじめよう！
RNA-Seq入門(キットの選び方、実験デザイン)
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
米田瑞穂

その他

- TruSeq Methylation (旧EpiGnome、販売予定)
- TruSeq Ribo-profile (旧ART-seq、販売予定)

今回ご案内させていただくTruSeqキット

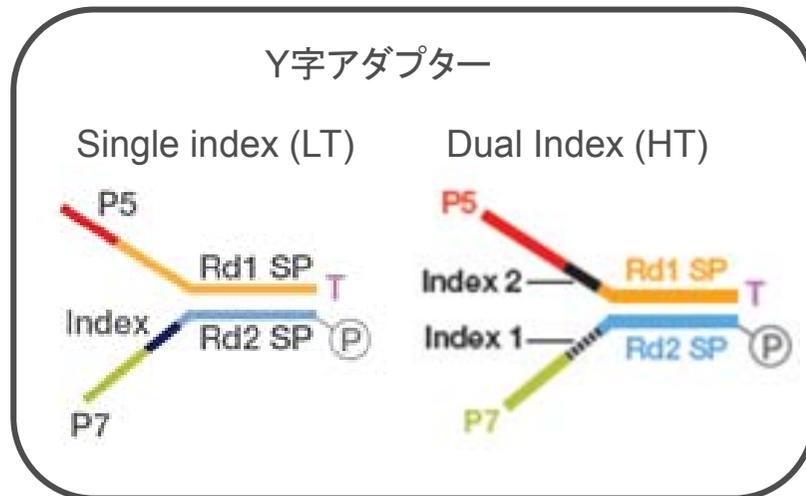
DNAキット

TruSeq DNA PCR-Free
TruSeq Nano DNA
TruSeq ChIP

RNAキット

TruSeq RNA V2
TruSeq Stranded mRNA
TruSeq Stranded total RNA

共通点: 2本鎖DNAに対してY字アダプターを付加させる。



利点: ライゲーション効率が高い。
アダプターダイマーの形成効率が小さい
必ず両端に異なるアダプターが結合する



TruSeq DNAキット (PCR-free, Nano, ChIP)

- ワークフロー
- Input DNA
- 断片化
- 最終ライブラリーのサイズ

キットに用いるDNA (Input DNA)

サンプル調製キット	推奨Input DNA量
TruSeq DNA PCR-Free	1 µg genomic DNA (350bp inserts) 2 µg genomic DNA (550bp inserts)
TruSeq Nano DNA	100 ng genomic DNA (350bp inserts) 200 ng genomic DNA (550bp inserts)
TruSeq ChIP	5-10 ng ChIP DNA

カバレッジ安定

ngオーダーから
少量サンプル用

品質は $A_{260/280nm}$: 1.8-2.0(Nanodropなどで)のサンプルを使用。

UV計測では、RNA, ssDNA, 塩基など
全てを検出してしまいます。
定量はQubit、クオリティーはNanodropで



二本鎖DNA(dsDNA)を検出する系で計測ください。
-> Qubit® 2.0 Fluorometer(以降Qubit® と記します)
/PicoGreen/QuantiFluorなど。

UV測定、Nanodropでの定量結果は推奨されません
結果として、低収量やサイズの異なるピークが得られる可能性があります。

Covarisによる断片化

- ▶ Covarisによる超音波破碎: 再現性高い、均等に切断、サンプルのロスが少ないなどの利点
<http://covarisinc.com/products/afa-ultrasonication/>

Table 19 Covaris S220 Settings

Setting	350 bp Insert	550 bp Insert
Duty factor	5%	
Peak Incident Power	175 W	
Cycles per burst	200	
Duration	50 seconds	25 seconds
Mode	Frequency sweeping	
Temperature	5.5° to 6°C	

Table 20 Covaris M220 Settings

Setting	350 bp Insert	550 bp Insert
Duty factor	20%	
Peak Incident Power	50 W	
Cycles per burst	200	
Duration	65 seconds	45 seconds
Temperature	20°C	

それぞれの装置にあった設定を守りましょう。

S220, M220, S2/E210

これらの設定は、Covaris社の指定した設定と異なり弊社で検証したものとなります。

Table 7 Covaris S2 and E210 Settings

Setting	350 bp Insert	550 bp Insert
Duty cycle	10%	
Intensity	5.0	2.0
Cycles per burst	200	
Duration	45 seconds	
Mode	Frequency sweeping	
Displayed Power	S2—23 W	S2—9 W
	E210—14 W	E210—7 W
Temperature	5.5° to 6°C	

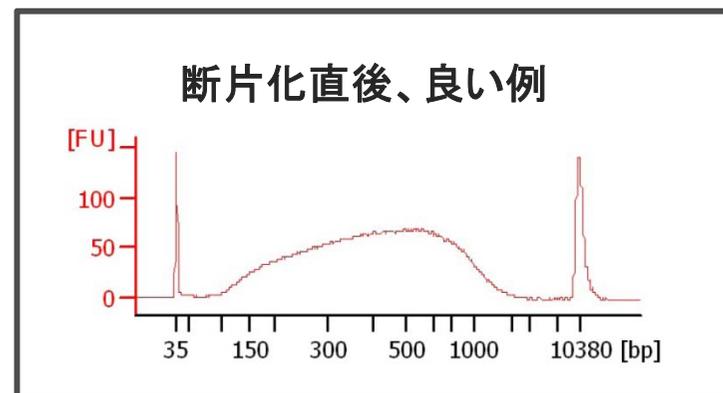
(ポイント)初めは断片化直後のサンプルでBioanalyzerでサイズチェックをすることを
お勧めいたします。

断片化DNAが期待のサイズと違う

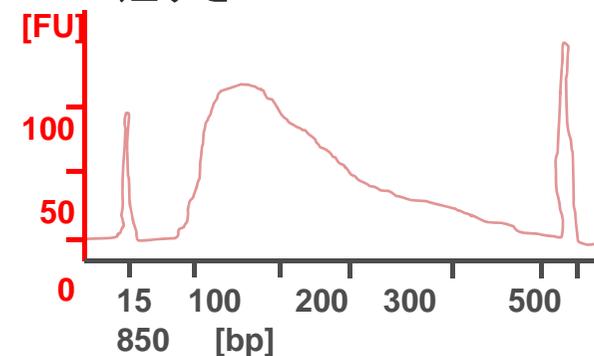
- ▶ Covarisの設定について下記を確認ください。
 - 装置に適した設定を使用しているか？
 - 気泡が多く入っていないか？
 - チューブを置く水浴の水位は適正か？
 - 水浴の温度が適正な値を示しているか？



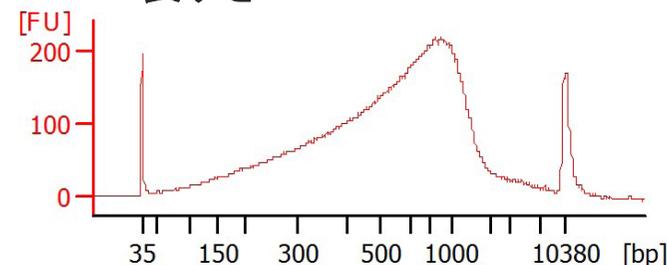
適正な断片長になっていないと、
低収量や予期しないライブラリーサイズが
得られる可能性がありますので、
コントロールDNAでチェックしてから
実サンプルでお試ください。



短すぎ



長すぎ



Input DNAの品質

- ▶ DNA量が適正に定量できていない。
 - DNA量多い⇒断片長長い傾向
 - DNA量少ない⇒断片長短い傾向

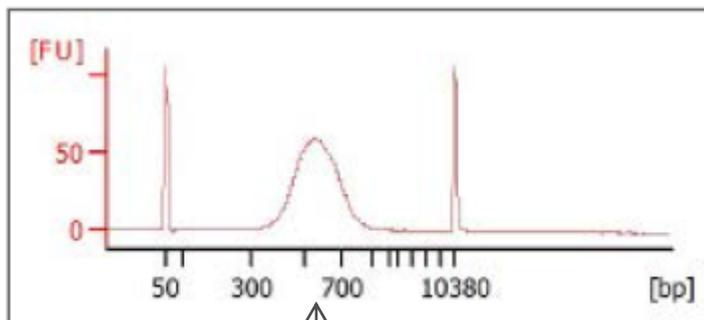
- ▶ 夾雑物があるとCovarisでの断片化が適正に行われな可能性がります。
 - 右のリストを参照ください。(下記のリンクにございます)
 - Nanodropなどで下記スコアを確認ください。
 - $A_{260/280nm}$: 1.8-2.0
 - $A_{260/230nm}$: 2.0-2.2

What Inhibitors Are Found in Different Sample Types?			
Sample Source Inhibitors	Inhibitory Effect	Likely Source	Methods to Minimize Inhibition
Fat	Template blocking	Adipose Tissue; Glycerol	Upase or hexane treatment and chloroform extraction, silica-based purification
Bile Salts	Template blocking	Feces, Stool	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Collagen	Template blocking	Skin, Connective Tissue	Use SDS, CTAB or guanidinium buffers, proteinase K, silica-based purification
Heme	Competition with MgCl ₂	Blood	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Humic Acid	Chelation of metal ions	Soil, Plant Material	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Melanin and Eumelanin	Enzyme Binding/ Template Blocking	Hair, Skin	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Myoglobin	Chelation of metal ions	Muscle Tissue	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Complex Polysaccharides	Template blocking	Feces, Plant Material	High salt precipitation, CTAB buffer, chloroform extraction, or use silica-based purification
Calcium Ions	Competition with MgCl ₂	Milk, Bone	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Urea	Enzyme denaturation	Urine	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Hemoglobin, Lactoferrin	Competition with MgCl ₂	Blood	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Immunoglobulin G (IgG)	Template blocking	Blood	Use SDS, CTAB or guanidinium buffers, proteinase K, silica-based purification
Indigo Dye; Tannic Acids	Template blocking	Specific Plants	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
What Inhibitors Are Found in Different Sample Treatments/Extraction Methods?			
Extraction Inhibitors	Inhibitory Effect	Likely Source	Methods to Minimize Inhibition
EDTA	Chelation of metal ions	TE buffer	Reduce EDTA concentration in TE buffer or simply use Tris-HCl (10 mM) or water as elution buffer
Alcohols	Enzyme denaturation	Ethanol, isopropanol, isoamyl alcohol	Dry pellet and resuspend or use silica-based purification
Excess Salts	Template blocking	KC _l , 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
Detergents/DDT	Enzyme denaturation	Sodium deoxycholate, SDS, Tween 20	Wash with 70% ethanol
Exogenous DNA/RNA	Template competition	Carryover	DNase I for DNA removal; RNase A for RNA, RNA:DNA hybrid removal
Carriers	Template competition/ 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 spin 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://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/pr9ujrEx7USo794O2k6G4Q/dnarna-isolation-considerations-when-using-truseq>

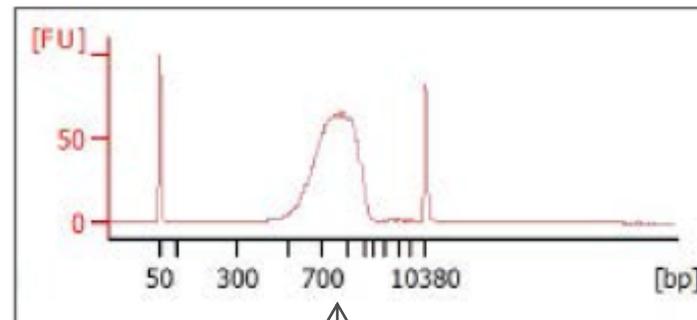
最終ライブラリーのサイズ- TruSeq Nanoライブラリー

350bpインサートのライブラリー



500bp前後にピーク

550bpインサートのライブラリー



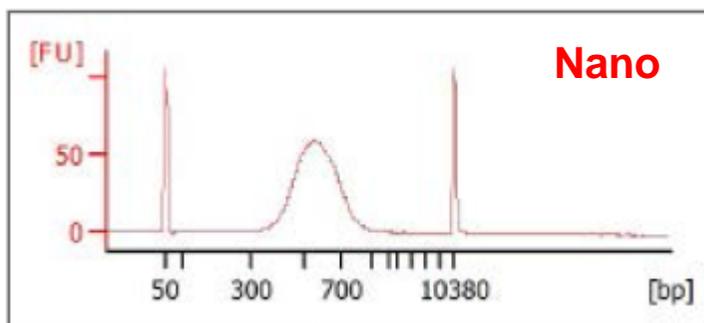
700bp前後にピーク

Single Index (LTキット)のアダプターは122bp、Dual Index (HTキット)のアダプターは136bpとなるので最終ライブラリーはインサート長からアダプターの長さだけ長くなる。

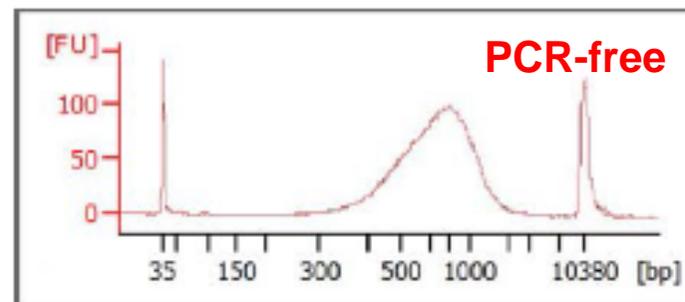
Quiz1

- ▶ 同じインサートサイズなのにTruSeq NanoライブラリーとTruSeq PCR-Freeライブラリーではサイズが200bp前後異なります。その理由は？

350bpインサートのライブラリー



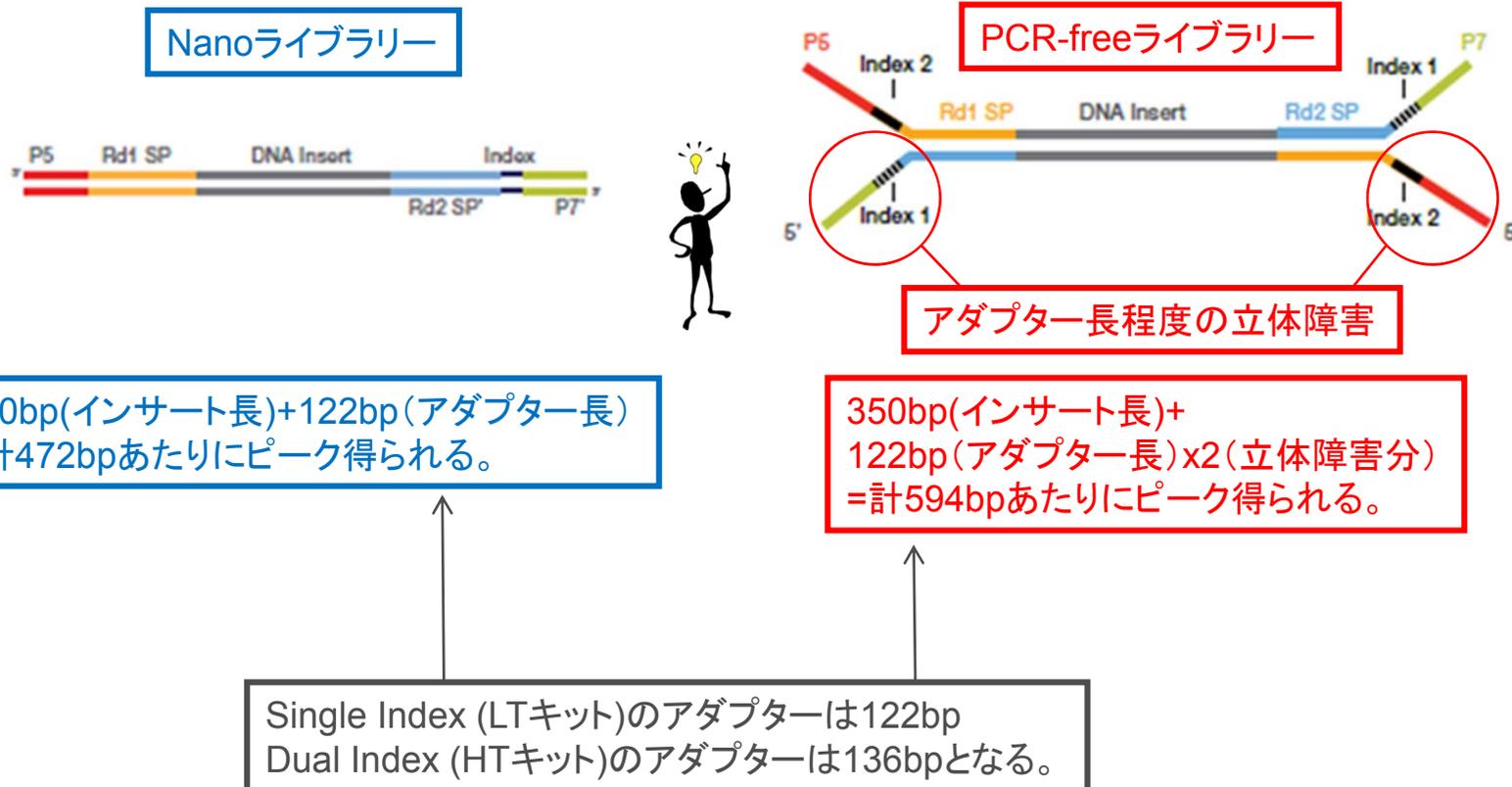
500bp前後にピーク



700bp前後にピーク

Ans1:最終ライブラリーの形が異なるからです。

- ▶ PCR-freeライブラリーはY字アダプターがついた状態
- ▶ NanoライブラリーはPCR後の完全なdsDNAとして回収されます。
- ▶ Y字アダプターは立体障害がありBioanalyzerで高分子側にシフトします。
→解析されるインサート長には影響ありません。



どのキットを使用して解析すればいいのか？ (何サイクル解析すればいいのか？)

- ▶ 推奨サイクル数は下記の通りになります。
 - 長いサイクル数での解析は可能ですが、オーバーラップが見られるReadが増える点ご了承ください。

Table 4 Insert Size Options

Insert Size	350 bp	550 bp
Input DNA Per Sample	1 µg	2 µg
Recommended Read Length	≤ 2 x 101 bp	≤ 2 x 151 bp*

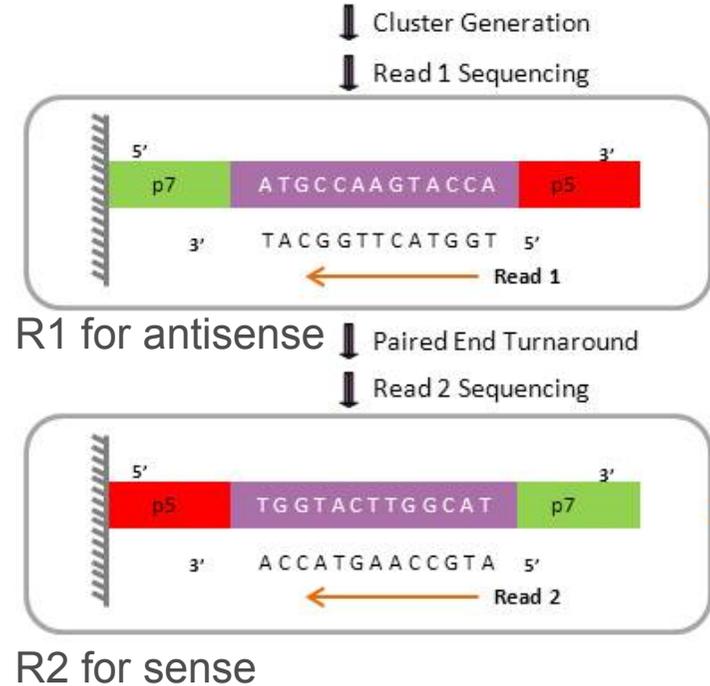
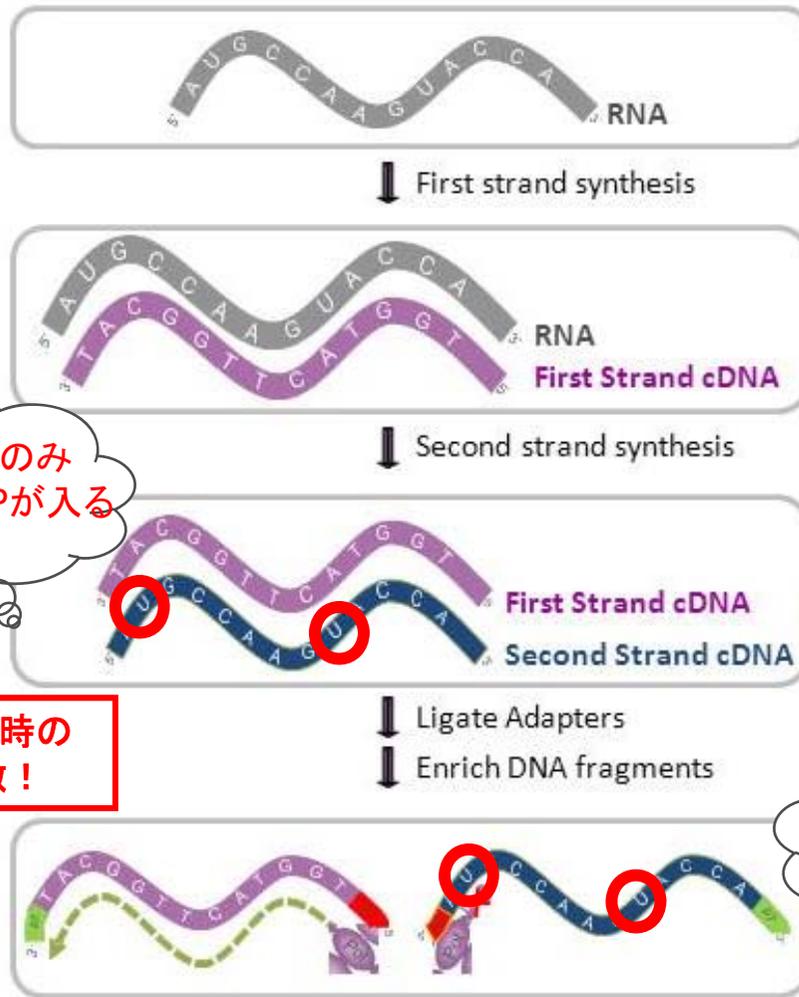
* Read lengths greater than 2 x 151 bp produce a significantly higher percentage of overlapping read-pairs.



TruSeq RNAキット (RNA V2, Stranded mRNA/Total RNA)

- Workflow
- Input material
- Fragmentation

Strand Information: どちらの方向で読まれるか？

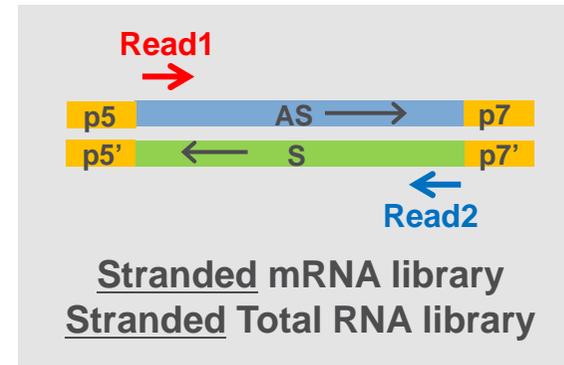
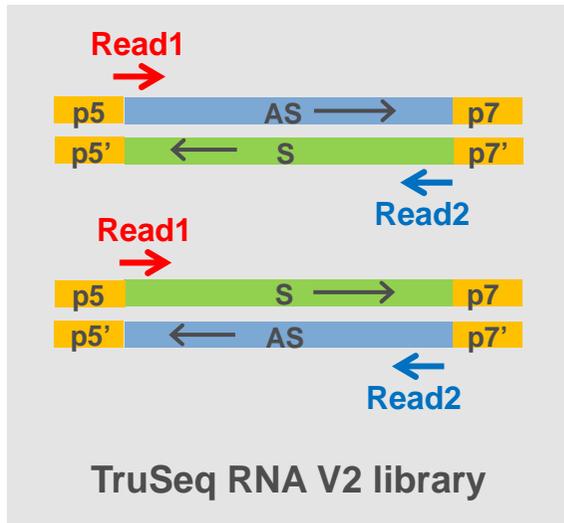


dUTPの入った鎖は PCR増幅されない

ほぼすべてのライブラリーで同じ方向にアダプターがつく

<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/rqBk3ucWxkusWKOXgFOBdA/which-read-maps-to-which-strand-in-the-truseq-stra>

Strand Information: どちらの方向で読まれるか？



mRNAキット、Total RNAキット共に
98%以上の高いストランド情報を示す。

Table 1: Stranded Parameters

RNA	TruSeq Sample Prep Method	Percent Aligned	Percent Stranded
Universal Human Reference	mRNA*	84.9%	99.6%
Human Reference Brain	mRNA	79.6%	99.0%
Universal Human Reference	Total RNA with Ribo-Zero**	79.0%	98.6%
Human Reference Brain	Total RNA with Ribo-Zero	73.0%	98.6%

Indexed, 2 x 75 cycle run on HiSeq® 2000; *Four mRNA samples per lane; ** Two Ribo-Zero samples per lane.

出典: Datasheet: Stranded RNA kits

Quiz2:

Quiz

- ▶ 分解したRNAに対してライブラリーを作製したい。
– どのキットがお勧めか？



RNAキット

TruSeq RNA V2
 TruSeq Stranded mRNA
 TruSeq Stranded total RNA
 TruSeq Small RNA
 TruSeq Targeted RNA
 TruSeq RNA Access

Ans2:

- ▶ TruSeq Stranded Total RNAか、TruSeq RNA Accessを使用ください。



RNAキット

TruSeq RNA V2

TruSeq Stranded mRNA

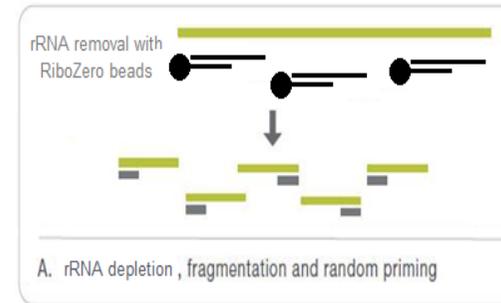
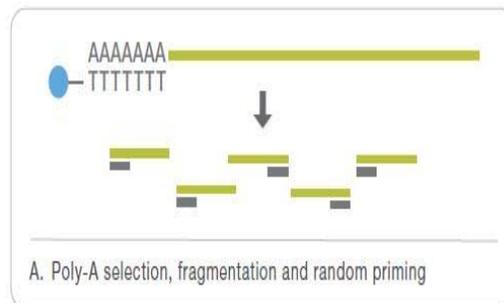
TruSeq Stranded total RNA: 分解RNA (FFPEなど)対応キット

TruSeq Small RNA

TruSeq Targeted RNA : 分解RNA (FFPEなど)対応キット

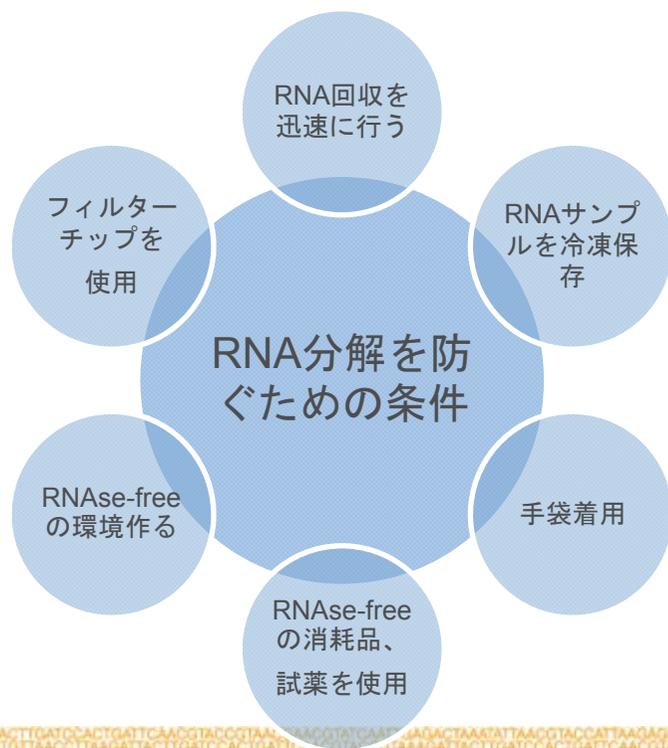
TruSeq RNA Access: 分解RNA (FFPEなど)専用キット

分解mRNAを
dTビーズで回収することはできませんが(RNA V2とStranded mRNA)、
rRNAを除去することは可能です(Stranded Total RNA)。



キットに用いるRNA (Input RNA)

サンプル調製キット	推奨Input量 (最適は1 ug)	クオリティー
TruSeq Stranded mRNA	0.1 - 4 μ g total RNA ¹⁾	高品質(RIN \geq 8)
TruSeq Stranded Total RNA	0.1 - 1 μ g total RNA	分解したDNAでも可能 (コントロールで検証必要)
TruSeq RNA v2	0.1 - 4 μ g total RNA ¹⁾	高品質(RIN \geq 8)



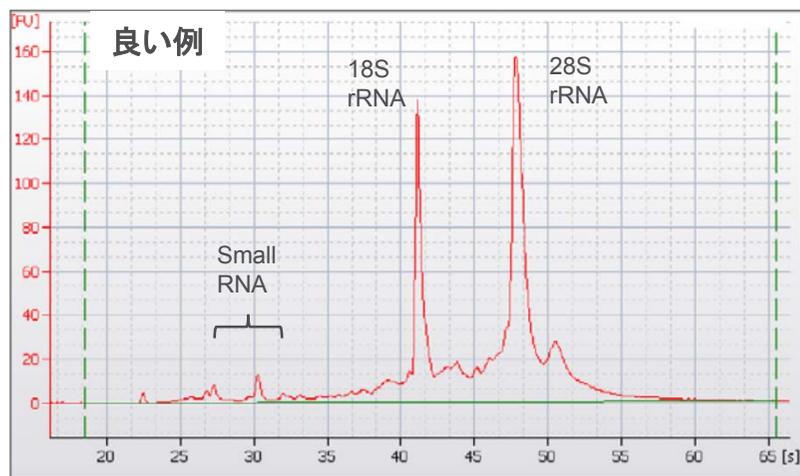
- ▶ 定量はQubit/RiboGreenを使用する。
 - UV定量、Nanodropはお勧めいたしません
- ▶ 1) それぞれ0.1 - 4 μ gのTotal RNAから精製したmRNAからの作製可能です。
 - 細かいプロトコールはユーザーガイドを参照ください。



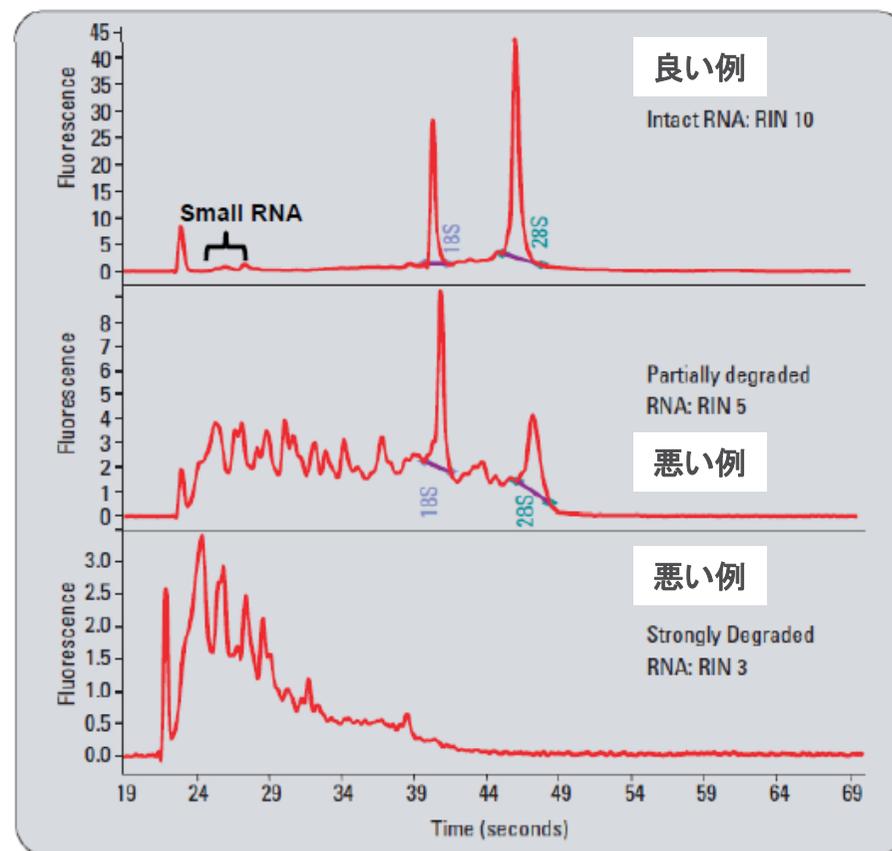
Purified mRNA Input

You can also use previously isolated mRNA as starting material. Use the entire fraction of mRNA purified from 0.1 μ g to 4 μ g of total RNA. If you start with isolated mRNA, follow the Illumina recommendations for isolated mRNA specified in the introduction of the Purify and Fragment mRNA procedures. Begin mRNA fragmentation with *Incubate RFP* on page 20 for LS processing or *Incubate RFP* on page 57 for HS processing.

Input RNAのクオリティ: RNA Integrity Number (RIN)



- ▶ Bioanalyzerで18S rRNAと28S rRNAのピークをもとに算出するRNA品質のスコア(10が最高)
- ▶ 必ずRIN8以上のRNAサンプルを使用する(RNA V2とStranded mRNA)
- ▶ 生物種によっては(植物や昆虫など)RINスコアが計れないものもあるので注意する。



- ▶ 分解が進むと18S/28Sのピークが不明瞭になり低分子量側にシフトする

http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Bioanalyzer_for_NGS_slideshow.pdf

RNAの断片化について(オプション)

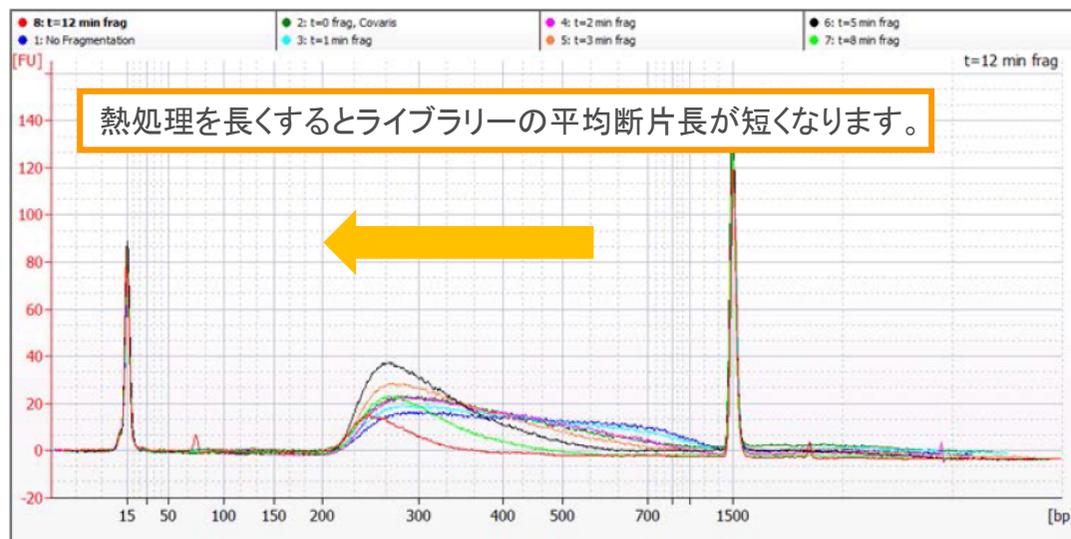
- ▶ RNAの断片化はカチオン存在下で高温(94°C)により行われます。

Table 12 Library Insert Fragmentation Time

Time at 94 °C (minutes)	Range of Insert Length ^a (bp)	Median Insert Length ^a (bp)	Average Final Library Size (Bioanalyzer bp)
0 ^b	130–350	200	467
1	130–310	190	439
2	130–290	185	410
3	125–250	165	366
4	120–225	160	326
8	120–210	155	309
12	115–180	140	272
Covaris ^c	130–280	180	385

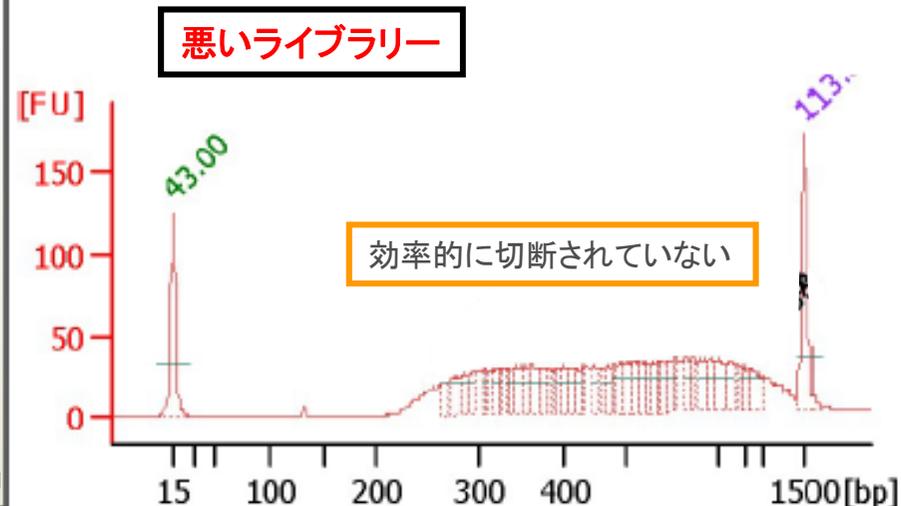
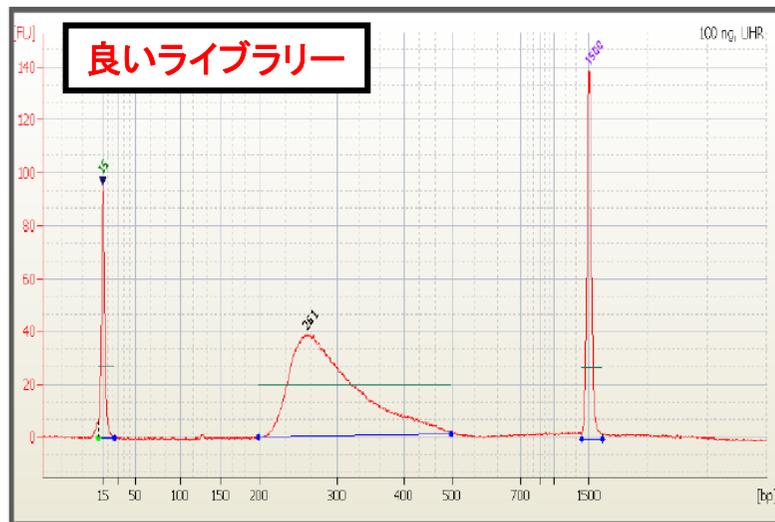
デフォルトは94°C, 8分で断片化しますが、熱処理の時間を変えることが可能です。

Figure 15 Shortened Fragmentation Time Results



RNA断片化がうまくいかない

- ▶ 最終ライブラリー産物のサイズは260bp程度になります。
 - (RNA V2, Stranded mRNA, Total RNAとも)
- ▶ 断片化がうまくいかない⇒クラスター密度(収量)低下などの原因となります。
 - Input RNAが多すぎた
 - 反応時間、温度のコントロールができていない



260bp前後にピーク (インサートサイズは130bp)



TruSeq DNAとTruSeq RNAで共通

- 試薬のハンドリング
- PCR装置周辺
- AMPure beads の取り扱い

試薬のハンドリングにご注意

注意点:

- PCR Master Mixなどは分注してfreeze-thawを必要最小限に
- それぞれのステップの前に必要な試薬を再チェック！
- 一部の試薬(ATL, LIGなど)は粘性が強いので要注意！

ユーザーガイド、Experienced User Cardのそれぞれのステップに必要な試薬がリストされている



TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep LS Protocol

Experienced User Card

Adenylyate 3' Ends

A single 'A' nucleotide is added to the 3' ends of the blunt fragments to prevent them from ligating to one another during the adapter ligation reaction. A corresponding single 'T' nucleotide on the 3' end of the adapter provides a complementary overhang for ligating the adapter to the fragment. This strategy ensures a low rate of chimera (concatenated template) formation.

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By
(Optional) A-Tailing Control (CTA)	1 tube per 48 reactions	-15° to -25°C	Illumina
A-Tailing Mix (ATL)	LT kit - 1 tube per 24 reactions or HT kit - 1 tube per 48 reactions	-15° to -25°C	Illumina
Resuspension Buffer (RSB)	1 tube	2° to 8°C	Illumina
Microseal 'B' Adhesive Seal	1	15° to 30°C	User
RNase/DNase-free Reagent Reservoirs (if using multichannel pipettes)	3	15° to 30°C	User
RNase/DNase-free Strip Tubes and Caps (if using multichannel pipettes)	3	15° to 30°C	User

Add ATL

- 1 Centrifuge the thawed A-Tailing Control (if using A-Tailing Control) and A-Tailing Mix tubes to 600 xg for 5 seconds.
- 2 Do one of the following:
 - If using the in-line control reagent, add 2.5 µl of thawed A-Tailing Control to each well of the ALP plate.
 - If not using the in-line control reagent, add 2.5 µl of Resuspension Buffer to each well of the ALP plate.

Adenylyate 3' Ends

ヒートブロックの温度調節をもう一度確認！

注意点:

- PCR装置の温度調節が正しく行われているか確認
- PCR装置などのヒートリッドが100°Cになっているのを確認:
 - 蓋に蒸発した水分がついてしまう
 - 結果、高い塩濃度で反応してしまう
 - 酵素活性が落ちてしまう



ヒートリッドが十分に熱くなっていないと
蓋に蒸発した水分がついてしまいます

96 well plateの蓋にする
シールも推奨品をご購入下さい



Not Heated



Heated



Size Selection/AMPure Beadsの取り扱い

お問い合わせ多いです！

準備

- 使用前にあらかじめビーズを室温に戻しておく
- ウォッシュに使用する80%EtOH溶液は用事調製

ハンドリング

- ボルテックスでしっかり懸濁
- 推奨のプレート (96-well PCR/MIDI)および Ambionの マグネティックスタンドを使用する。
- ピペティングを丁寧にを行う。

乾燥

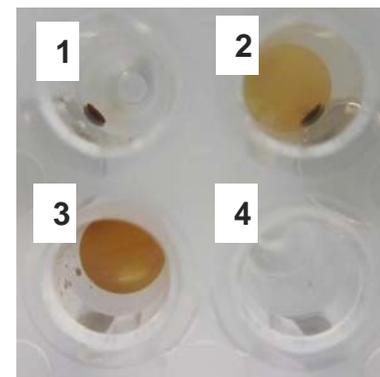
- 静電気や風によるビーズのロスを防ぐためプレートをマグネティックスタンドに置いたまま乾燥する。

Size Selection Beads



TruSeq PCR-free Nanoキットにはビーズ(SPB)が付属しています

AMPure XP Beads



- 1) 透明な状態
- 2) まだ透明でない状態
- 3) 懸濁状態
- 4) ビーズがない状態

http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product01/AMPure_xp.html



ライブラリーの評価: Bioanalyzerのデータ

過去のウェビナーを参照ください

http://www.illumina.com/events/webinar_japan/support_webinar.ilmn

2013/10/18
イリミナサポートウェビナーシリーズ2013
Bioanalyzerを使用したLibrary QCとトラブルシューティング
イリミナ株式会社 テクニカル サポート サイエンティスト
田中敦成

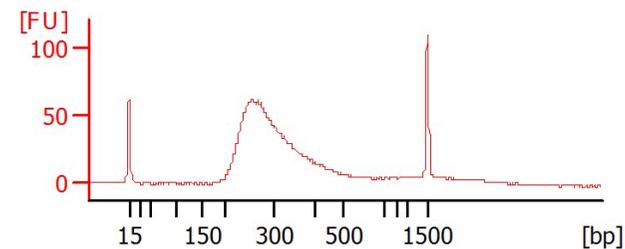
GTATCATTAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTTACCGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTACT
ACTTAACAGCTTGTGTTAAGCTTAAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA
GCTGTAACACTTAAGAGACTTGTGTTAAGCTTAAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA
CTTCTCAGCTTAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA
CAATTAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA
ATAACACTTAAGAGACTTGTGTTAAGCTTAAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA
GTATCATTAAGATTAATTGATCCACTGATTCACAGTAAACGGAGGAGTATCAATTAAGACTAAATAATAAGGTATCAATTAAGAGGTTACCGTTCAGAGCGGAAAGAAATGATAAAGTAAACACACTTCTGTTAAGCTTAAAGCGAAGGTATCAATTAAGATTA

TruSeq DNAとRNAライブラリーの評価

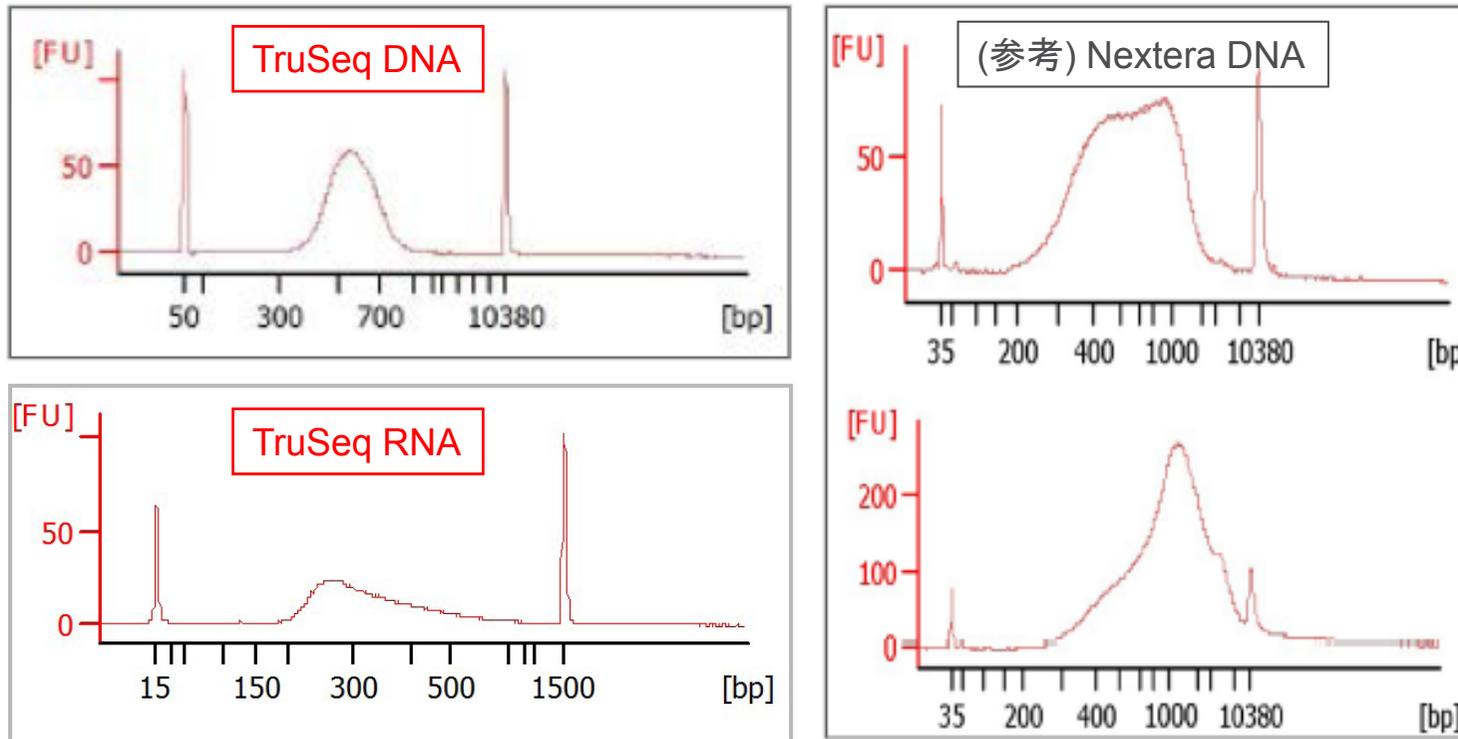
- ▶ 定量チェックはqPCRで実施
 - KAPA社のライブラリー定量キットにはPrimer/Standardが付属しています。
http://www.n-genetics.com/product_detail.html?item_id=4332



- ▶ 定性チェックはBioanalyzerで実施



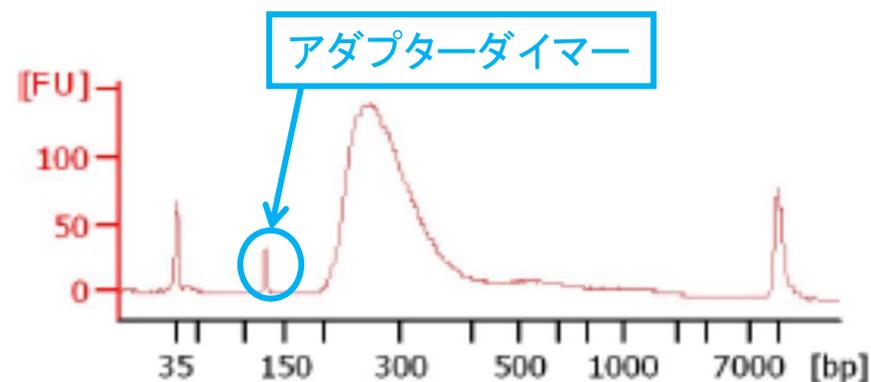
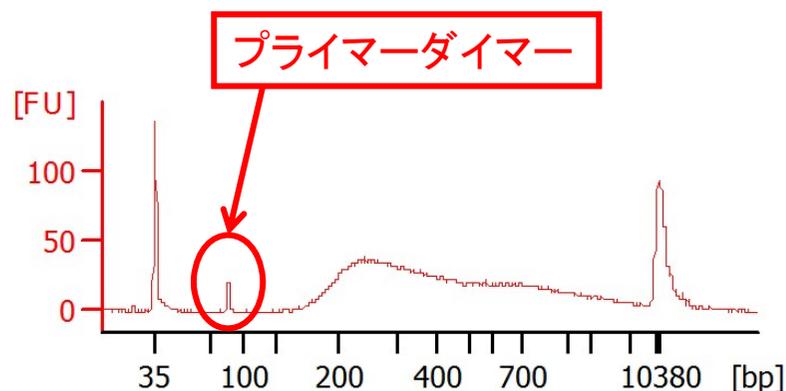
良いTruSeq DNAとRNAライブラリーの例



TruSeqライブラリーはNexteraライブラリーに比べてライブラリーのサイズが安定し、シャープなピークとして見られます。
⇒インサート長が一定に近く均一なリード長が得られます。

Bioanalyzerのトレースからトラブルの原因を予想

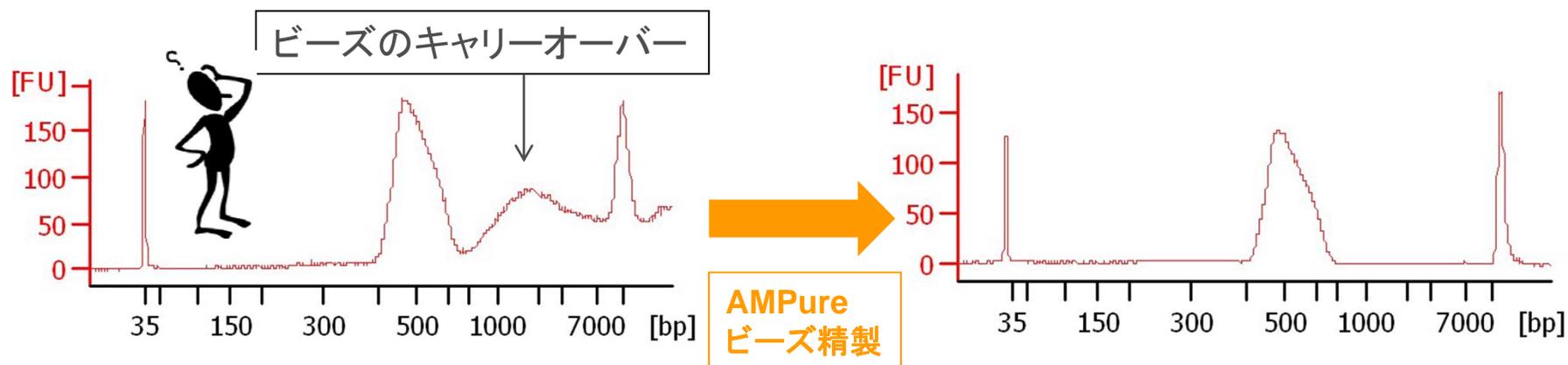
[短いピーク]



- ▶ **プライマーダイマー(~100bp)**はフローセルに結合するがクラスターは形成しない。
 - AMPure beads精製ができていない、あるいは増幅前の収量が著しく悪い、など。
- ▶ **アダプターダイマー(~125bp)**はシーケンスデータに影響が出る。
 - AMPure beads精製ができていない、Input DNA/RNAが少ない・クオリティーが悪い。
 - 試薬の保存状況などに利End RepairやA-tailingの効率が悪くなってしまった。
- ▶ **解決策: AMPureビーズでの精製をやり直す。ゲル精製する。**
 - プライマーダイマーの場合はそのままシーケンスすることも可能。

Bioanalyzerのトレースからトラブルの原因を予想

[長いピーク]

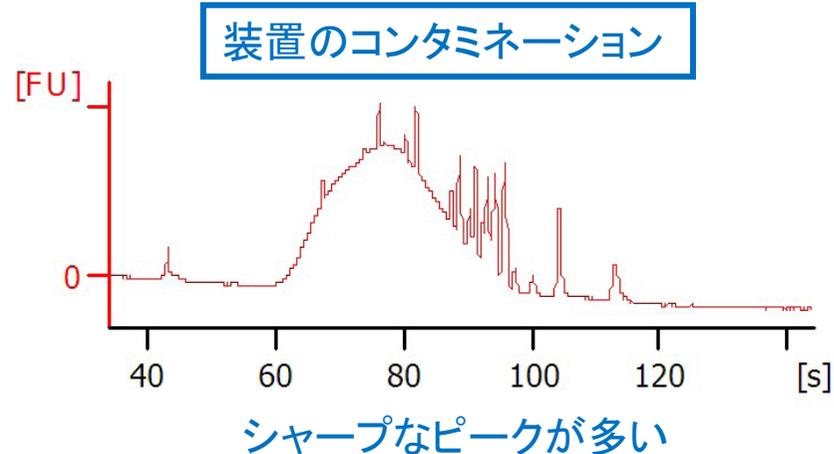
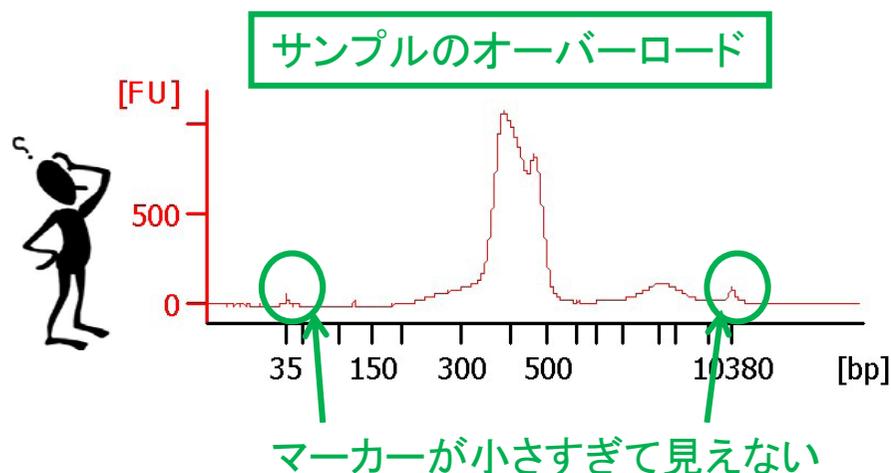


- ▶ ライブラリーの回収時にビーズが混入すると高分子マーカにかかるとピークが見られる(=ビーズのキャリーオーバー)。
 - ビーズ精製の際のマグネティックスタンドを変える。
 - ピペッティングでしっかり溶出する。
 - マグネティックスタンド上でのビーズの回収を適正な時間行う。

- ▶ 解決策: 再度AMPureビーズで精製することにより除去可能。

Bioanalyzerのトレースからトラブルの原因を予想

[Bioanalyzer由来の症状]



- ▶ Bioanalyzerの取扱説明書に従って測定ください。
 - アプライ量が多すぎてマーカーが見えない。
 - 装置の状態が悪く変なピークが入ってしまう。
- ▶ **解決策: サンプルのアプライ量を確認ください。装置のウォッシュを適正に実施ください。**
 - Agilent High Sensitivity DNA: 5-500 pg/μL
 - Agilent DNA 1000: 0.1-50 ng/μL
 - RNA 6000 Nano Total RNA: 5-500 ng/uL
 - RNA 6000 Pico Total RNA: 50- 5000 pg/uL



弊社ウェブ上のサポートツールのご案内

それぞれのキットのサポートページを参照ください。

- ▶ 製品のサポートページは下記になります(例)。
 - TruSeq PCR-free: http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/truseq-dna-pcr-free-ht-kit.html
 - TruSeq Nano: <http://support.illumina.com/downloads/truseq-nano-dna-library-prep-guide-15041110.html>

The screenshot shows the Illumina website's navigation menu. The 'SUPPORT' menu item is highlighted with a red box. A red callout box points to it with the text: "Support"プルダウンメニューから"Kit&Reagents"を選ぶ. Below the menu, the 'Kits & Reagents' sub-item is also highlighted with a red box. A red arrow points from this box to a red-bordered box containing two product support pages: 'TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit Support' and 'TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit Support'. A red callout box points to this area with the text: 購入したキットを選択. The background of the screenshot shows a 'HiSeq Series' banner with images of sequencing equipment and a 'Log In' button.

キットのサポートページの例

The screenshot shows the support page for the TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit. On the left, a navigation menu lists various resources, each highlighted with a colored box and connected to a callout box on the far left. The callout boxes contain the following text:

- Red box: **キットの内容物 保存温度** (Kit contents, storage temperature)
- Green box: **Input DNA/RNA の量および質** (Input DNA/RNA quantity and quality)
- Blue box: **関連ソフトウェアのダウンロード** (Download related software)
- Purple box: **各種資料** (Various documents)
- Light green box: **トレーニング動画** (Training video)
- Red box: **FAQ**
- Orange box: **今後のウェビナー スケジュール** (Future webinar schedule)

The main content area of the page includes:

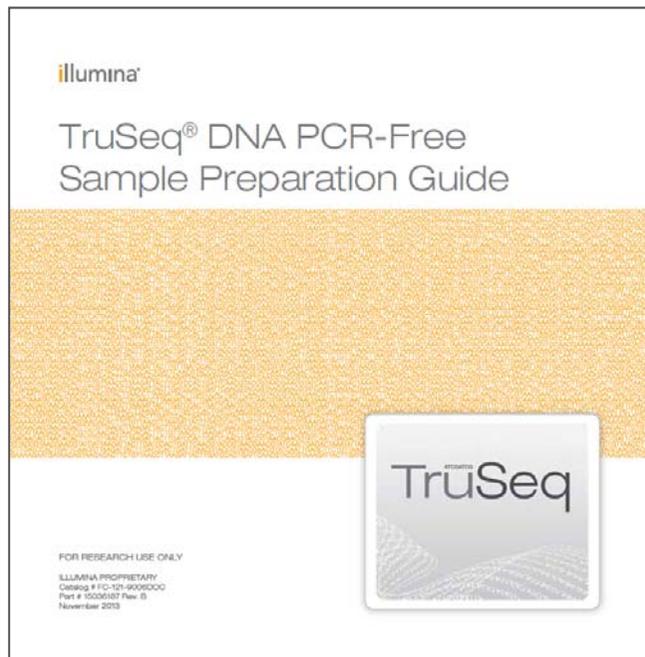
- Header: Support » Sequencing » Kits and Reagents » TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit
- Product Name: TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit
- Catalog IDs: FC-121-3003
- Latest Updates section with links to: Custom Protocol Selector 03/10/2015, Illumina Experiment Manager v1.9 03/09/2015, and Illumina Experiment Manager Guide 03/09/2015.
- Features section listing: Easy-to-use 96-well plate, pre-loaded with 96 unique index combinations; Robust dual index system; Optimized shearing for whole-genome resequencing with 350 bp and 550 bp insert size workflows; Bead-based size selection reagents included in kit; Designed for manual or automated preparation; Compatible with all Illumina sequencers; End-to-end solution from sample prep to data analysis.

http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/truseq-dna-pcr-free-ht-kit.html

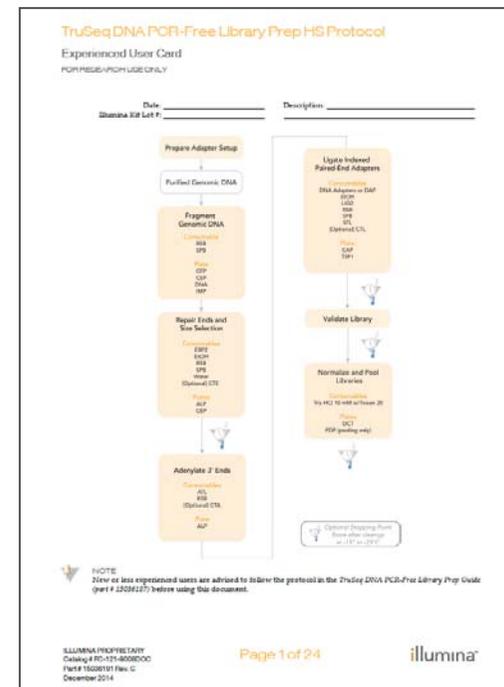
2種類の資料をご用意ください

- ▶ Userguide: 細かい手順をご案内した資料。取扱説明書。
 - TruSeq PCR-free: <http://support.illumina.com/downloads/truseq-dna-pcr-free-library-prep-guide-15036187.html>
 - TruSeq Nano : 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
 - TruSeq PCR-free (HS): <http://support.illumina.com/downloads/truseq-dna-pcr-free-experienced-user-card-hs-15036191.html>
 - TruSeq Nano (HS): <http://support.illumina.com/downloads/truseq-nano-dna-experienced-user-card-hs-15041112.html>

Userguide



Experienced User Card

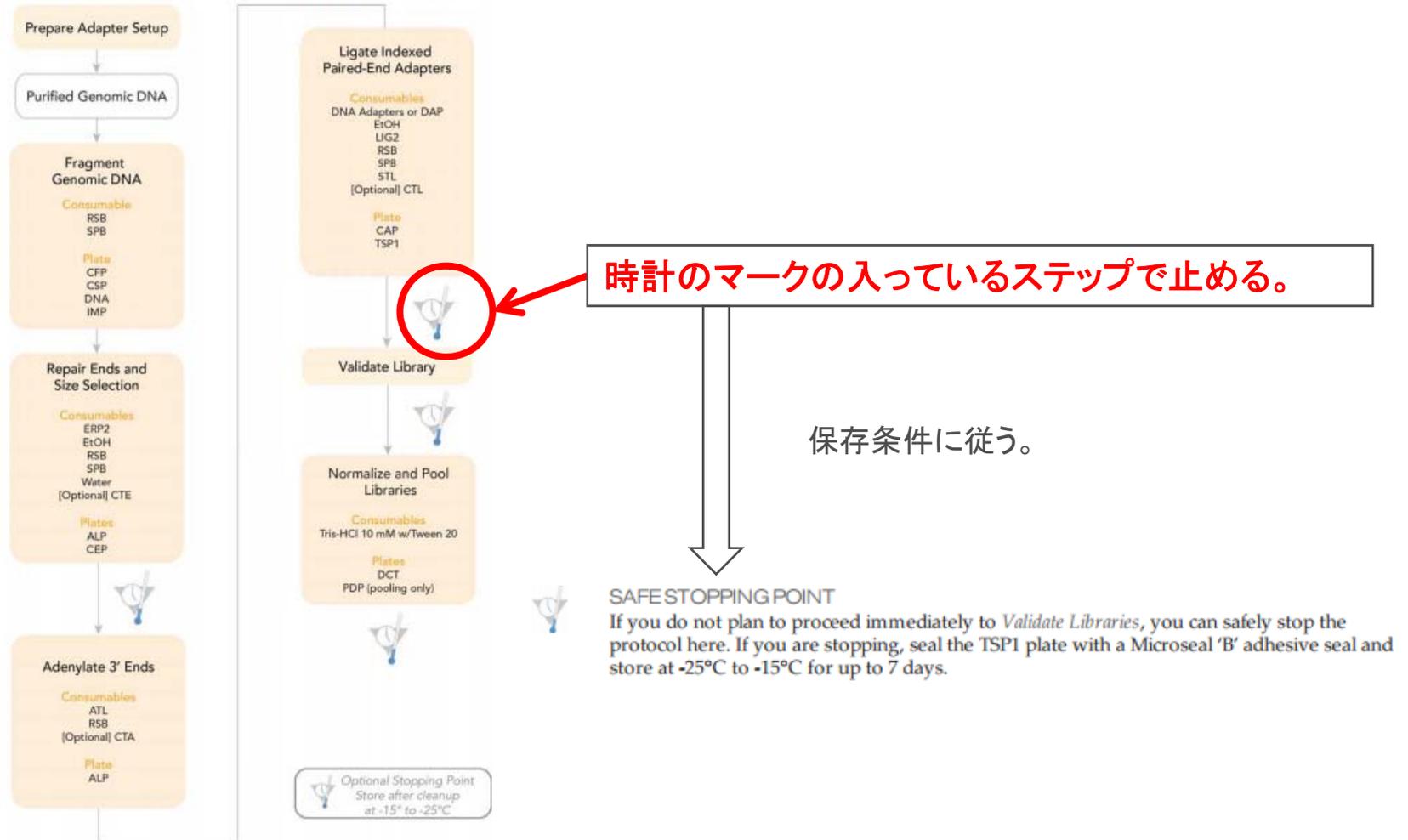


中断できるステップを確認ください

Library Prep Workflow

The following figure illustrates the TruSeq DNA PCR-Free Library Prep LS workflow.

Figure 1 TruSeq DNA PCR-Free Library Prep LS Workflow



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。

それぞれのキットのデモデータがBaseSpace上にございます。

[TruSeq DNA PCR-Free 350 bp library](#)

[TruSeq DNA PCR-Free 550 bp library](#)

[TruSeq Nano DNA 350 bp library](#)

[TruSeq Nano DNA 550 bp library](#)

[TruSeq Stranded mRNA Sample Prep data set](#)

Support Bulletins:

[DNA/RNA Isolation Considerations When Using TruSeq Library Prep Kits](#)

[Sequencing Kits for FFPE samples](#)

[Considerations for RNA-Seq Read Length and Coverage](#)

[How do I deplete bacterial ribosomal RNA for Illumina RNA sequencing?](#)

[Will a TruSeq Stranded Total RNA kit work with my organism?](#)

[Sequencing Solutions for Low Inputs of RNA](#)

[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。