

# TruSeq Custom Amplicon Low Input Kitを用いたターゲットリシーケンス – ウェット編 –

February 19, 2016



米田 瑞穂  
イllumina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

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDX, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, 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 US and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®

# 本日のOutline

- ▶ TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Inputの概要・特長
- ▶ プロトコル



# TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Input Kit 概要



## はじめに

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、10ng のゲノム DNA (gDNA) を使ったターゲットリシーケン  
ス用に完全なカスタマイズが可能なアンプリコンベースのアッセイ  
です。この拡張性があるアッセイにより、一回の反応で、対象  
となる複数のターゲットを同時にキャプチャーして、1つのプール  
で 1536 までのアンプリコンをシーケンスすることが可能です。  
TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット  
は、保存された腫瘍組織などのホルモン固定パラフィン包埋  
(FFPE) サンプルに柔軟に対応します。MiSeq® システムや  
NextSeq® システムでの使用に最適化されたこのアッセイにより、  
低頻度の体細胞変異の検出に必要な高精度と高いカバレッジ  
均一性が得られます。一貫した結果が得られる統合されたワーク  
フローにより、TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラ  
リー調製キットは、ターゲットリシーケンスの実施に信頼性の高い、  
迅速で使いやすいソリューションを提供しています。

Data Sheet: Amplicon Sequencing

### TruSeq® Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット

アンプリコンシーケンスのための自在なカスタムソリューションで、少量インプットおよび  
FFPE 由来 DNA サンプルから高精度で詳細な結果を取得

**特徴**

- **少量の DNA インプットと FFPE サンプルに対応**  
わずか 10 ng のゲノム DNA インプット量で、新しい  
FFPE サンプルから高精度に変異を検出
- **信頼性の高いデータ**  
最適化されたプロトコルにより高い均一性と特異性を  
実現
- **迅速なワークフロー**  
わずか 3 時間のヒンズオンタイムでライブラリー調製を  
6.5 時間ですべて完了。自動化しやすいワークフロー
- **シームレスなワークフローソリューション**  
豊富なデータ解析を含む、フルサポートの最適化された  
ワークフローソリューション

加え、イルミナサポートチームの総合的な専門知識により、迅速  
な問題解決や試みのためのゲノムデータの価値が保証されています。  
イルミナのコンセルジュサービスをご利用いただけます。カスタ  
ム/パネル作成時のプローブデザインや性能評価など、追加のサ  
ポートもお受けいただけます。\*

**少量の DNA インプット**

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット  
は、わずか 10ng の gDNA からさまざまな DNA インプット量に  
対応しているため、精度に制限のあるサンプルからも確実にデー  
タを取得できます。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サン  
プルにも対応し、DNA の品質に応じて 10ng-50ng の FFPE 由来  
DNA でスタートすることができます。この優れた一貫性のある  
パフォーマンスを誇るアッセイにより、DNA スタースターの多少  
を問わず、安定した結果を得ることが可能です (図 2)。

**はじめに**

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット  
は、10ng のゲノム DNA (gDNA) を使ったターゲットリシーケン  
ス用に完全なカスタマイズが可能なアンプリコンベースのアッセ  
イです。この拡張性があるアッセイにより、一回の反応で、対象  
となる複数のターゲットを同時にキャプチャーして、1つのプール  
で 1536 までのアンプリコンをシーケンスすることが可能です。  
TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット  
は、保存された腫瘍組織などのホルマリン固定パラフィン包埋  
(FFPE) サンプルに柔軟に対応します。MiSeq® システムや  
NextSeq® システムでの使用に最適化されたこのアッセイによ  
り、低頻度の体細胞変異の検出に必要な高精度と高いカバレッジ  
均一性が得られます。一貫した結果が得られる統合されたワーク  
フローにより、TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラ  
リー調製キットは、ターゲットリシーケンスの実施に信頼性の高い、  
迅速で使いやすいソリューションを提供しています。

**包括的なソリューション**

イルミナが提供するアンプリコンシーケンス用に統合されたワー  
クフローでは、デザインから解析までフルサポートのソリュー  
ションをご利用いただけます (図 1)。TruSeq Custom Amplic  
on Low Input ライブラリー調製キットは、イルミナのシーケン  
サーでお使いいただくようデザインが最適化されています。他  
の装置での追加作業は必要ありません。ライブラリー調製から  
シーケンス、さらにデータ解析までの技術スペシャリストおよび  
フィールドスペシャリストによる一貫したサポートに

\* NextSeq® システムと HiSeq® システムにも対応しています。  
※ 本製品の使用目的は研究に限定され、診断の使用ではありません。

**確かなアッセイデザイン**

TruSeq Custom Amplicon Low Input オリゴデザインソフトウェア  
は、最適化されたカバレッジを提供する、無料で使いやすいイン  
ラインツールの Illumina DesignStudio™ ソフトウェアでデザ  
インされています (図 3)。DesignStudio は、あらゆる遺伝子  
を平均 100 以上の siko カバレッジで網羅し、TruSeq  
Custom Amplicon Low Input をデザインしています。最も一  
般的な 20 の遺伝子で、DesignStudio は、平均 97% 以上の  
siko カバレッジを実現しています。イルミナのコンセルジュサー  
ビスでは、ターゲットカバレッジを上げるための追加のサポート  
を提供しています。

† イルミナのコンセルジュサービスでは、siko デザインでの最適化から  
結果の siko 値の検証や変更、診断に必要で、専門的な支援を提供して  
います。詳細については、弊社のウェブサイトをご覧ください。

‡ 最終の結果を得るために、イルミナでは、10ng の DNA インプットを推奨  
しています。

新しいサンプルから、安定した信頼性の  
高い 10ng の DNA インプットと FFPE サンプルに対応

デザイン  
ライブラリー調製  
シーケンシング  
データ解析

イルミナクラウド  
OncoPrint™

TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit  
MiSeq/NextSeq

イルミナのコンセルジュサービス

[http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_tru\\_seq\\_custom\\_amplicon\\_low\\_input.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_tru_seq_custom_amplicon_low_input.pdf)

# TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Input Kit 概要

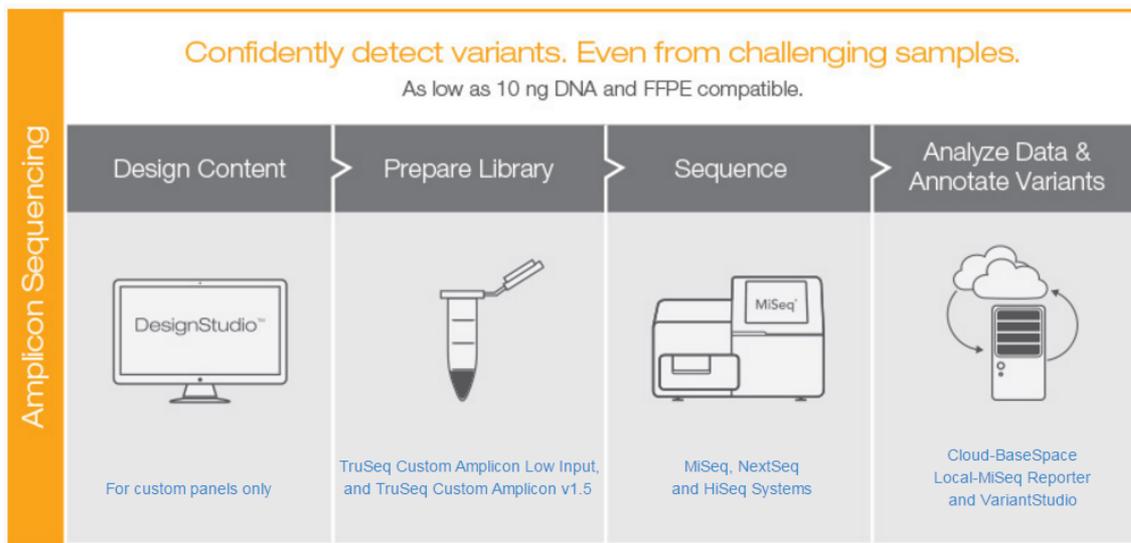
表 1 : TruSeq Custom Amplicon Low Input アッセイ仕様

パラメーター	仕様
搭載された参照ゲノム	ヒト マウス ラット ウシ
その他の生物種	トウモロコシ、イネ、ブタ、イヌ、タイズ、ニワトリ、ヒツジ
カスタムの参照ゲノム	イルミナのコンシェルジュが提供する専門知識を利用して、あらゆる生物種でのカスタムパネルがデザインできます。
アンプリコンサイズ	150bp、175bp、および 250bp
FFPE 由来 DNA に推奨されるアンプリコンサイズ	150bp または 175bp
パネルあたりのオリゴプール数	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 標準デザイン : 1</li> <li>● 二本鎖デザイン : 2</li> </ul>
アンプリコンプレックス数 (1 プール)	● 16-1536
シーケンスデータの品質	90% 以上の塩基配列が Q30 以上
二本鎖シーケンス	DesignStudio でデザイン可
カバレッジ均一性	80% 以上の塩基配列を平均カバレッジの 20% 以上でカバー
特異性	オンターゲットアライメントリード数 70% 以上

# TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Input Kitの特長

## ▶ 包括的なソリューション

アンプリコンのデザインからライブラリー調製、シーケンス、さらにデータ解析までイルミナのソリューションで対応可能。



イルミナiSchool 初級編

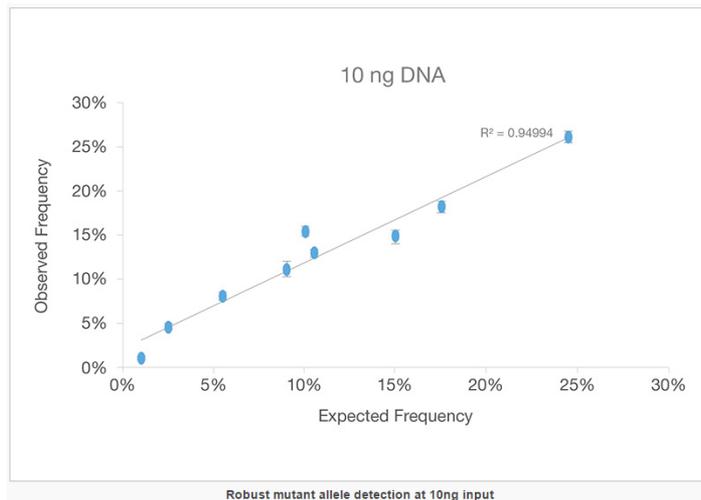
DesignStudioを用いたプローブデザインの方法と最適化のヒント

ダウンロード: <http://jp.illumina.com/events/webinar.html>  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

# TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Input Kitの特長

## ▶ 少量のinput DNA量、固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織のDNAサンプルにも対応

- input DNA量: 10 -100ng
- FFPEサンプルに対応したQCキットをご用意。シーケンス要件を満たすサンプルのみを選択して調製可能。



### <ポイント>

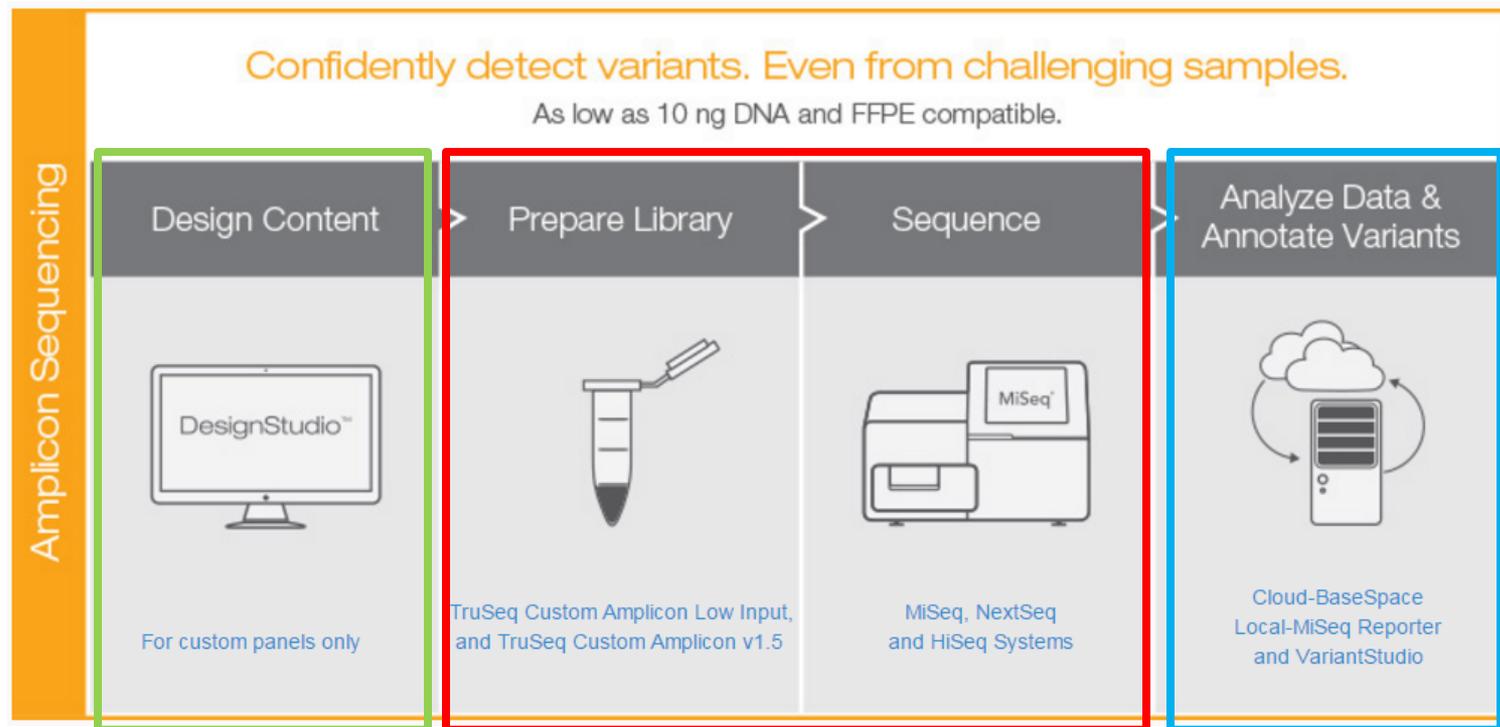
- input DNA量が多い方がライブラリー収量が多くなり、また特異性(aligned read%)等のシーケンスメトリクスが改善されます。
- FFPEサンプルの場合、Dual strandの方が精度が高くなるためおすすめ

# 本日のOutline

- ▶ TruSeq Custom Amplicon (TSCA) Low Inputの概要・特長
- ▶ プロトコル



# プローブデザインから解析までのワークフロー



2016年1月22日  
イルミナiSchool 初級編  
「DesignStudioを用いたプローブデザインの方法  
と最適化のヒント」

ダウンロード: <http://jp.illumina.com/events/webinar.html>  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

2016年3月11日  
イルミナiSchool 初級編  
「TruSeq Custom Amplicon Low Input Kitを  
用いたターゲットリシーケンスードライ編-」

登録: [http://jp.illumina.com/events/ilmn\\_support\\_program/ilmn-ischool.html](http://jp.illumina.com/events/ilmn_support_program/ilmn-ischool.html)

# 消耗品・装置

ユーザーガイド Consumables and Equipment をご確認ください。

<http://support.illumina.com/downloads/truseq-custom-amplicon-low-input-library-prep-reference-guide-100000002191.html>

## Supporting Information

### Consumables and Equipment

Make sure that you have the required user-supplied consumables and equipment before starting the protocol.

The protocol has been optimized and validated using the items listed. Comparable performance is not guaranteed when using alternate consumables and equipment.



#### NOTE

- Use a dedicated set of consumables and equipment for pre-PCR and post-PCR procedures.
- The TruSeq Custom Amplicon Low Input library prep protocol requires different magnetic stands for pre-PCR and post-PCR procedures.

### Consumables

Consumable	Supplier
10 N NaOH (prepare from tablets or use a standard solution)	General lab supplier
20 µl barrier pipette tips	General lab supplier
20 µl multichannel pipettes	General lab supplier
20 µl single channel pipettes	General lab supplier
200 µl barrier pipette tips	General lab supplier
200 µl multichannel pipettes	General lab supplier
200 µl single channel pipettes	General lab supplier
1000 µl barrier pipette tips	General lab supplier
1000 µl multichannel pipettes	General lab supplier
1000 µl single channel pipettes	General lab supplier
One of the following plate types:	

# 消耗品·装置

## Thermal Cyclers

### Thermal Cyclers

Use the following recommended settings for selected thermal cycler models. Before performing library prep, validate any thermal cyclers not listed.

Thermal Cycler	Block Type	Ramp Rate	Lid Temp	Block Rate	Vessel Type
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2	Standard	0.1°C	Heated, Constant at 100°C	--	Bio-Rad Hard-Shell 96-Well Skirted PCR Plates, low-profile, skirted
Bio-Rad S1000	Standard	0.1°C	Heated, Constant at 100°C	--	Bio-Rad Hard-Shell 96-Well Skirted PCR Plates, low-profile, skirted
Bio-Rad C1000	Standard	0.1°C	Heated, Constant at 100°C	--	Bio-Rad Hard-Shell 96-Well Skirted PCR Plates, low-profile, skirted
Bio-Rad T100	Standard	0.1°C	Heated, Constant at 100°C	--	Eppendorf twin.tec PCR Plate 96, semi-skirted
Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Gold	4%	Heated, Constant at 100°C	9600 (for HYB and EXT_LIG programs) or MAX (for PCR program)	Eppendorf twin.tec PCR Plate 96, semi-skirted
Applied Biosystems Veriti 96-Well	Alloy	2%	Heated, Constant at 100°C	--	Eppendorf twin.tec PCR Plate 96, semi-skirted

# 消耗品・装置

## 磁気スタンド

One of the following magnets, depending on the PCR plate type used:

- DynaMag-96 Side Skirted Magnet (use with 96-well full-skirted PCR plates)
- DynaMag-96 Side Magnet (use with Eppendorf 96-well twin.tec PCR plates)

Magnetic stand-96 (use with midi 96-well storage plates)

Life Technologies:

- catalog # 12027
- catalog # 12331D

Life Technologies, catalog # AM10027



Magnetic Stand



Magnetic Stand

## Plate Shaker

One of the following:

- BioShake iQ high-speed thermal mixer
- BioShake XP high-speed lab shaker

Q.Instruments:

- order # 1808-0506
- order # 1808-0505

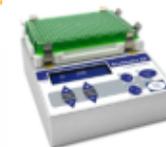


Plate Shaker

# ワークフロー

DesignStudioを使用して、ターゲット領域の両側に対応する  
カスタムオリゴキャプチャープローブを作製



1

断片化されていないゲノムDNAの目的の上流と  
下流領域にCATプローブがハイブリダイズ



2

カスタムプローブ間のターゲット領域全体を  
伸長/ライゲーション



3

PCRによりインデックスとシーケンスプライマーを付加



4

固有のインデックスが付加されたアンプリコンライブラリーは  
クラスター形成およびシーケンスに直接使用可能



**<ポイント>**

FFPEサンプルの場合、  
Dual strandの方が精度  
が高くなるためおすすめ

# ワークフロー

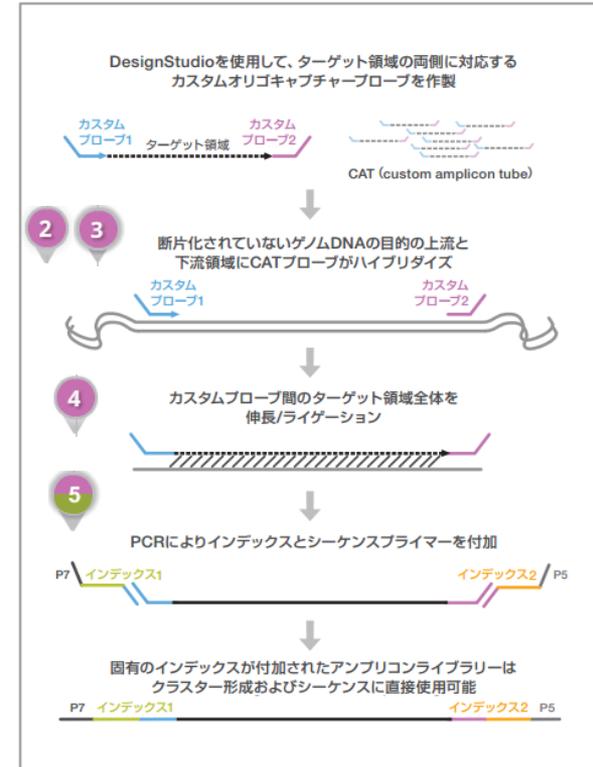
## TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Workflow

### Pre-amplification

- 1 Quantify and Dilute DNA
- 2 Hybridize Oligo Pool
- 3 Remove Unbound Oligos
- 4 Extend-Ligate Bound Oligos
- 5 Amplify PCR

### Post-amplification

- 6 Clean Up PCR
  - 7 Normalize Libraries
  - 8 Pool Libraries
- Cold Storage Option
- [Click each step to learn more.](#)



# ステップ1 input DNAの定量と希釈

## 定量と希釈

### クオリティ確認

- ▶ TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kitを用いて、FFPEサンプルのクオリティとinput DNA量を決定する。

Type of DNA	Supported Amplicon Size (bp)	DNA Quality	$\Delta Cq$	Input (ng) <sup>1,2</sup>
Genomic DNA	150, 175, 250	High	--	10
FFPE genomic DNA	150, 175	High	-1 to 1	10
		Medium	>1.0-2.5	20-50
		Low	2.5-4.0	50-100

※ TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Reference Guideを元を実施

#### <ポイント>

Input DNA量が多い方がライブラリー収量が多くなり、また特異性(aligned read%)等のシーケンスメトリクスが改善されます。

### 定量、希釈

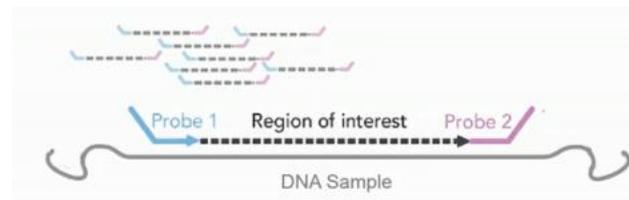
- ▶ 二本鎖DNA (dsDNA) に固有の蛍光定量ベースの方法を使用してDNA量を測定
  - 同じ蛍光定量ベースの測定装置を使用して、希釈したinput DNA量を再測定
  - 希釈したInput DNAをRS1、SS1と混合

試薬	容量
10-25 ng/ul input DNA	1 ul
RS1	3 ul (input DNA量に合わせる)
SS1 (x5)	1 ul

# ステップ2 オリゴプールのハイブリダイズ

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ



## プローブ、コントロールDNAの希釈

- ▶ LoBindチューブに2.5 uLのCAT (Custom Amplicon Oligo Tube)と2.5 uLのRS1を加えて、よく攪拌後、スピンドウンする。サンプル数分調製する。
- ▶ LoBindチューブに2.5 uLのACP3と2.5 uLのRS1を加えて、よく攪拌後、スピンドウンする
- ▶ LoBindチューブに2 uLの2800M、2 uLのRS1、および2 uLのSS1を加えて、よく攪拌後、スピンドウンする

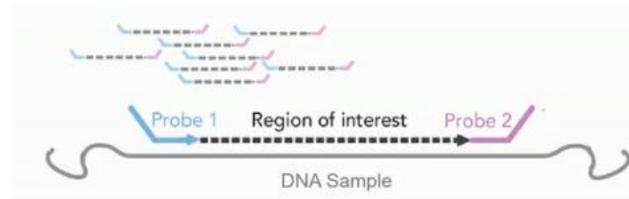
## サンプル、プローブを96ウェルプレートへ分注

- ▶ 96 ウェルプレートの1ウェルに5 uLの希釈した2800Mを加える
- ▶ 続けて、希釈した2800Mの入ったウェルに5 uLの希釈済みACP3を加えてアッセイコントロールとする
- ▶ 1ウェルに5 uLのRS1を加えてno templateコントロールとする
- ▶ 残っているウェルに5 uLの希釈したinput DNAを加えていく
- ▶ 2800M以外のウェルに5 uLの希釈済みCATを加える

# ステップ2 オリゴプールのハイブリダイズ

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ



- ▶ 各ウェルに15 uLのOHS2を加える
- ▶ もし泡が入った場合には、100 xgで20秒遠心する

## <Best Practice>

- ゆっくりピペッティングして混合する
- 20 uLのピペットを使用する

## ハイブリダイズ

- ▶ サーマルサイクラーにプレートセットし、下記のプログラムを実行する

- 1) ヒートリッドオプションを100°Cに設定
- 2) 95°C for 1分間
- 3) 90°C for 30秒間  
これを0.5°Cずつ下げて60.5°Cまで各温度で行う  
1秒あたり0.1°Cのrumpを設定する
- 4) 60°C for 1分間  
これを0.5°Cずつ下げて50.5°Cまで各温度で行う  
1秒あたり0.1°Cのrumpを設定する
- 5) 50°C for 2分間  
これを1°Cずつ下げて41°Cまで各温度で行う  
1秒あたり0.1°Cのrumpを設定する
- 6) 40°C for 10分間  
1秒あたり0.1°Cのrumpを設定する

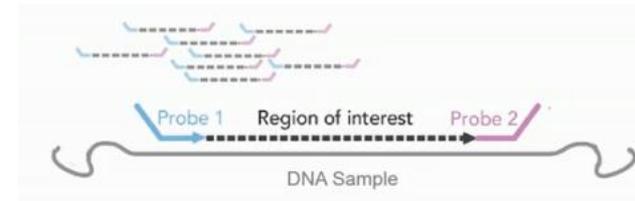
Temperature (°C)	Hold Time	Ramp Speed
90	30 seconds	0.1°C per second
89.5	30 seconds	0.1°C per second
89	30 seconds	0.1°C per second
88.5	30 seconds	0.1°C per second
88	30 seconds	0.1°C per second
87.5	30 seconds	0.1°C per second
87	30 seconds	0.1°C per second
86.5	30 seconds	0.1°C per second
86	30 seconds	0.1°C per second
85.5	30 seconds	0.1°C per second

# ステップ3 未結合オリゴの除去

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去



## ELE/ELBの調製

- ▶ サーマルサイクラーでオリゴプールをハイブリダイズさせている間に、ELEとELBを以下の通りに混合する

16サンプルの場合	18 uLのELEをELB tubeに加える。
96サンプルの場合	137 uLのELEをELB tubeに加える。

※ボルテックスはしない。転倒混和によって混合すること

- ▶ あとの工程「Extend-Ligate Bound Oligos」で使用するまで氷上に置いておく



## 未結合オリゴの除去

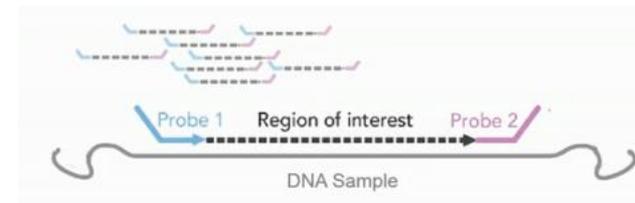
- ▶ ハイブリダイズが完了したあと、96ウェルプレートをサーマルサイクラーから取り出す
- ▶ 各ウェルに 25 uLのSample Purification Beads (SPB)を加える。ゆっくりピペッティングして混合する。
- ▶ 室温で5分間インキュベート

# ステップ3 未結合オリゴの除去

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去



- ▶ 磁気スタンド上に2分間 (または、溶液が濁っている場合は透明になるまで)置く
- ▶ 上清を捨てる
- ▶ ビーズを洗浄するために以下の操作を3回繰り返す
  - 80 uLのSW1を各ウェルに加える
  - 室温で30秒間インキュベート
  - 上清を捨てる
- ▶ 20 uLのピペットを使用して残っているSW1を取り除く
- ▶ 80 uLの60%エタノールを各ウェルに加える
- ▶ 室温で30秒間インキュベート
- ▶ 上清を捨てる
- ▶ 20 uLのピペットを使用して残っている60%エタノールを取り除く
- ▶ 最大で5分間風乾させる



## <Best Practice>

- 次のステップへすぐに進む

# ステップ4 Extension-Ligation反応



定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

## Extension-Ligation

- ▶ 各ウェルに22 uLのELE/ELM混合液を加えたあと、20 uLのピペットで混合する。

### <Best Practice>

- 20 uLのピペットを使用して混合する(100 uLまたは200 uLのピペットは、混合液を調製する際にのみ使用する)
  - ピペットにビーズが残っていないことを確認する
- 
- ▶ もし泡が入った場合には、100 xgで20秒遠心する
  - ▶ サーマルサイクラーにプレートを設定し、下記のプログラムを実行する
- 1) ヒートリッドオプションを100°Cに設定
  - 2) 37°C for 45分間
  - 3) 70°C for 20分間
  - 4) Hold at 4°C

# ステップ4 Extension-Ligation反応



定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

## EDP/EMMの調製

- ▶ この間にEDPとEMMの混合液を以下のようにLoBindチューブを用いて調製する

サンプル数	EDP	EMM
1サンプル	1.1 uL	21 uL
16サンプル	17.6 uL	334 uL
96サンプル	106 uL	2006 uL

- ▶ 次のPCRステップで使用するまで氷上に置く

# ステップ5 PCR

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

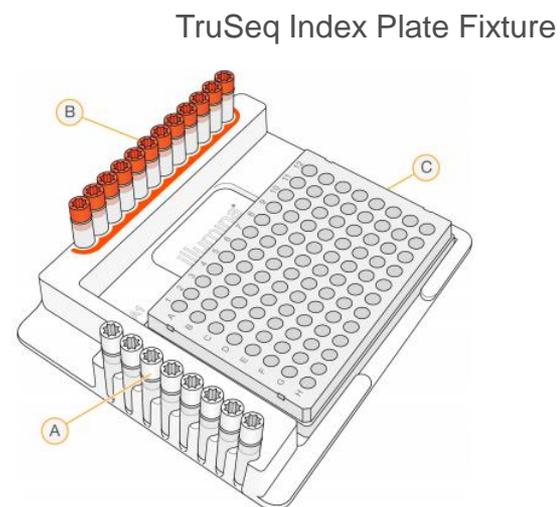
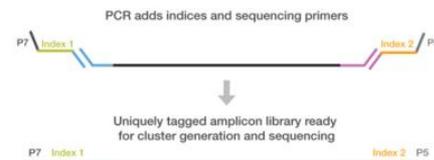
PCR

## PCR反応液の調製

- ▶ 使用するIndex1、Index2それぞれのインデックスプライマーをTruSeq Index Plate Fixtureに配置する
- ▶ 22 uLのサンプルDNAにPCRの試薬を加える。氷上で行う。

試薬	容量
DNA	22 uL
Index1 Primer	4 uL
Index2 Primer	4 uL
EDP/EMM	20 uL

- ▶ ピペットで混合する
- ▶ 280 xgで20秒遠心した後、氷上に置く



- A Rows A-H: Index 2 (i5) adapters (white caps)
- B Columns 1-12: Index 1 (i7) adapters (orange caps)
- C HYP plate

# ステップ5 PCR

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

PCR

## PCR

▶ サーマルサイクラーにプレートを設定し、下記のPCRプログラムを実行する

1) ヒートリッドオプションを100°Cに設定

2) 95°C for 3分間

3) X cycle of:

98°C for 20秒間

67°C for 20秒間

72°C for 40秒間

4) 72°C for 1分間

5) Hold at 10°C

Plexity	Number of PCR Cycles (X) <sup>1,2</sup>
< 96 amplicons	32
97-384 amplicons	29
385-700 amplicons	28
701-1536 amplicons <sup>3</sup>	28

※FFPEサンプルの場合、1サイクル追加

※input DNAが10 ng以下の場合、1サイクル追加

※アンプリコンのサイズが大きく、アンプリコン数が多い場合には、  
サイクル数を減らしても良い

### Safe stopping point

プレートにシールをした後、2~8 °Cで2日間まで保存可。

あるいはサーマルサイクラーにオーバーナイトで置いておく。

# ステップ6 精製

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

PCR

精製

## 精製

- ▶ PCRプレートをサーマルサイクラーより取り出し、280 xgで1分間遠心
- ▶ 45 uLのサンプル溶液をプレートより取り出し、新しい96ウェルMIDIプレートに移す
- ▶ よく懸濁したSample Purification Beads (SPB)を36 uL添加
- ▶ 1800 rpmで2分間プレートを撹拌
- ▶ 室温で5分間インキュベート
- ▶ 280 xgで1分間遠心
- ▶ 磁気スタンド上にプレートを2分間(または、溶液が濁っている場合は透明になるまで) 置く
- ▶ 上清を捨てる
- ▶ 以下の洗浄操作を2回繰り返す
  - 200 uLの80% EtOHを各ウェルに加える
  - 室温で30秒間インキュベート
  - 上清を捨てる



MIDIプレート:  
96ウェル0.8 ml深底プレート

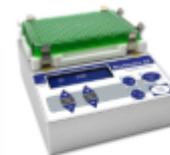


Plate Shaker

## ステップ6 精製 続き

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

PCR

精製

- ▶ 20 uLのピペットを用いて各ウェルに残っているEtOHを取り除く
- ▶ 磁気スタンド上からプレートをはずし、室温で5分間風乾する
- ▶ 続けて25 uLのRSBを各ウェルに加える
- ▶ 1800 rpmで2分間プレートを撹拌。必要ならピペットでさらに撹拌を行う。
- ▶ 室温で2分間インキュベート
- ▶ 280 xgで1分間遠心
- ▶ 磁気スタンド上にプレートを2分間(または、溶液が濁っている場合は透明になるまで) 置く  
精製されたライブラリーが完成
- ▶ 20 uLの精製されたライブラリーを新しい96ウェルプレートに移す

### Safe stopping point

プレートにシールをした後、 $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$ で6カ月間保存可能。

# ステップ6 精製 続き

定量と希釈

オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

Extension-Ligation  
反応

PCR

精製

## ライブラリーの定性確認

- ▶ PCR産物の予想サイズは、以下の通り

Amplicon Size	Expected PCR Product Size
150 bp	~280 bp
175 bp	~310 bp
250 bp	~350 bp
2800M	~310 bp

- ▶ 以下のいずれかの方法で残存溶液からライブラリーとコントロールサンプルの定性を確認する

- 1) 4%アガロースゲルに5 uLのサンプルを泳動
- 2) 6サンプルまでの場合、DNA 1000 chipを用いて1 uLのサンプルをBioanalyzerで測定
- 3) 16-96サンプルの場合、Standard Sensitivity NGS Fragment Analysisを用いて2 uLのサンプルをAdvanced Analytical Fragment Analyzerで測定
- 4) 2-96サンプルの場合、D1000 ScreenTape assayを用いて1 uLのサンプルをTapeStation用いて測定

# ステップ6 精製 続き

定量と希釈

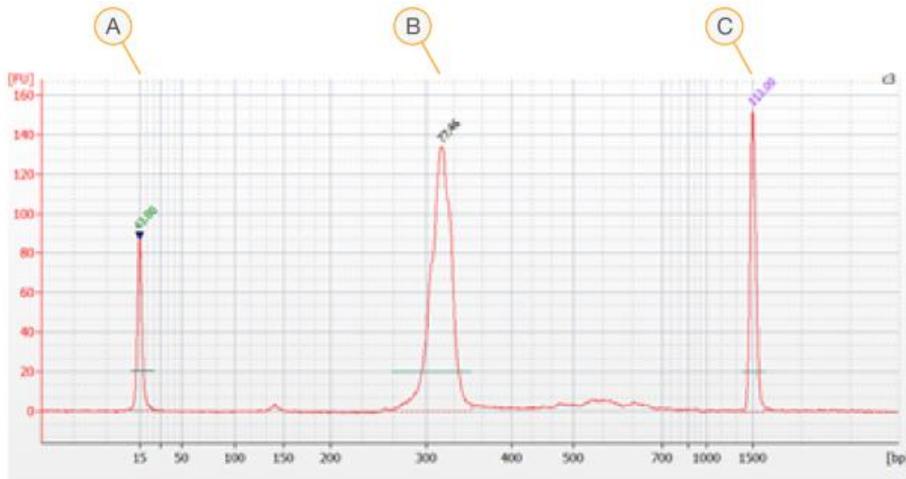
オリゴプールの  
ハイブリダイズ

未結合オリゴ  
の除去

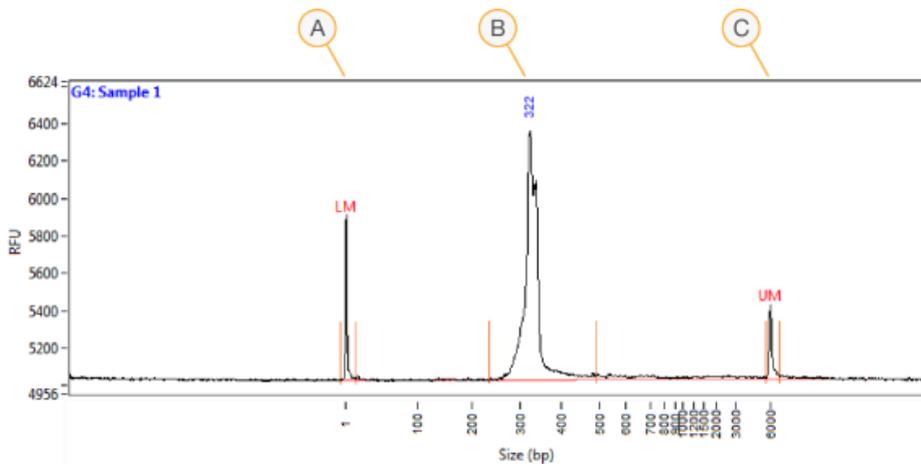
Extension-Ligation  
反応

PCR

精製



Amplicon Size	Expected PCR Product Size
150 bp	~280 bp
175 bp	~310 bp
250 bp	~350 bp
2800M	~310 bp



- A Marker
- B Expected PCR Product for 200 bp amplicons (~350 bp)
- C Marker

# ステップ7 Normalization

PCR

精製

Normalization

## LNA1/LNB1の調製

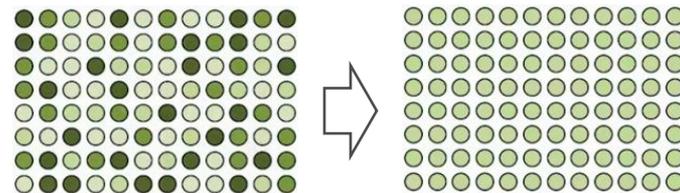
- ▶ 1ライブラリーあたり44 uLのLNA1を15 mLコニカルチューブに加える
- ▶ 続けて1000 uLのピペットを使用して1ライブラリーあたり8 uLのLNB1を加える。転倒混和する。

## Normalization

- ▶ 45 uLのLNA1/LNB1溶液を各ウェルに加える
- ▶ 1800 rpmで30分間プレートを攪拌
  - ※ 30分間以外の条件の場合、ライブラリーの表現型とクラスター密度に影響する可能性あり
- ▶ 磁気スタンド上にプレートを2分間  
(または、溶液が濁っている場合は透明になるまで) 置く
- ▶ 上清を捨てる
- ▶ 磁気スタンドからプレートを取り外す

### <Best Practice>

- LNA1とLNB1の調製は1000 uLのピペットを使用する
- 混合は全体的に攪拌されていることを確認しながら実施する



# ステップ7 Normalization 続き

PCR

精製

Normalization

- ▶ 以下の洗浄操作を2回繰り返す
  - 45 uLのLNW1を各ウェルに加える
  - 1800 rpmで5分間プレートを撹拌
  - 磁気スタンド上にプレートを2分間(または、溶液が濁っている場合は透明になるまで) 置く
  - 上清を捨てる
- ▶ 20 uLのピペットを用いて残存しているLNW1を各ウェルから取り除く
- ▶ 直前に調製した0.1 N NaOHを30 uL加える
- ▶ 1800 rpmで5分間プレートを撹拌
- ▶ もし撹拌が不十分な場合は、ピペットで混合した後、続けて1800 rpmで5分間プレートを撹拌
- ▶ 磁気スタンド上にプレートを2分間(または、溶液が濁っている場合は透明になるまで) 置く
- ▶ 30 uLのLNS2を新しい96ウェルプレートに加える
- ▶ 磁気スタンドに置いたプレートから上清30 uLを取り、LNS2が入ったプレートに加える
- ▶ 1000 xgで1分間遠心

## Safe stopping point

プレートにシールをした後、-25°C~-15°Cで30日間保存可。

# ステップ8 ライブラリーのプール

PCR

精製

Normalization

ライブラリーの  
プール

## ライブラリーのプール

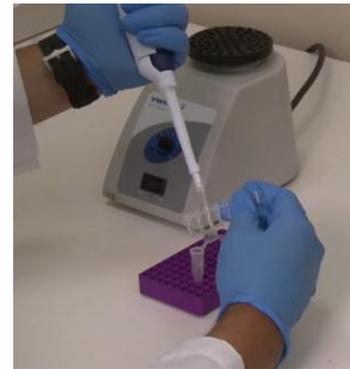
- ▶ プレートを1000 xgで1分間遠心
- ▶ 5 uLのライブラリーを8連チューブに移す。

### Safe stopping point

プレートにシールをした後、-25°C~-15°Cで7日間保存可。



- ▶ 1つのエッペンドルフチューブに上記ライブラリーを移す。ピペッティングして混合する。プールしたライブラリーが完成
- ▶ プールしたライブラリーをランに用いる。



# MiSeqランのセットアップ ライブラリーのロード

## ライブラリーのロード

- ▶ プールしたライブラリーとHT1を混合する

### MiSeq

<u>Amplicon Library Pool</u>	<u>Prechilled HT1</u>
6 $\mu$ l	594 $\mu$ l
7 $\mu$ l	593 $\mu$ l
8 $\mu$ l	592 $\mu$ l
9 $\mu$ l	591 $\mu$ l
10 $\mu$ l	590 $\mu$ l

[http://support.illumina.com/downloads/prepare\\_libraries\\_for\\_sequencing\\_miseq\\_15039740.html](http://support.illumina.com/downloads/prepare_libraries_for_sequencing_miseq_15039740.html)

### NextSeq

<u>Library Pool</u>	<u>Prechilled Hybridization Buffer</u>
2 $\mu$ l	998 $\mu$ l
3 $\mu$ l	997 $\mu$ l
4 $\mu$ l	996 $\mu$ l
5 $\mu$ l	995 $\mu$ l

<http://support.illumina.com/downloads/nextseq-500-denaturing-diluting-libraries-15048776.html>

- ▶ System User Guideにしたがって、シーケンスを行う

# TSCA Low Input Kit Training動画

## ● Training

[https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/truseq-custom-amplicon-low-input/training.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/truseq-custom-amplicon-low-input/training.html)

The screenshot displays the Illumina support website interface. At the top, the Illumina logo is on the left, and navigation links for 'MyIllumina', 'Quick Order', 'View Cart', 'Contact Us', and 'English' are on the right. Below this is a main navigation bar with categories like 'AREAS OF INTEREST', 'TECHNIQUES', 'SYSTEMS', 'PRODUCTS & SERVICES', 'INFORMATICS', 'SCIENTIFIC CONTENT', 'COMPANY', and 'SUPPORT'. A search bar is also present. The breadcrumb trail indicates the current page is 'Support > Sequencing > Kits and Reagents > TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit > Training'. The main content area features a video player titled 'TruSeq Custom Amplicon Low Input' with a sub-title 'Remove Unbound Oligos'. The video shows a person in blue gloves using a pipette to transfer liquid into a multi-well plate. The video player includes a progress bar showing '00:27 / 01:31' and navigation buttons for 'BACK' and 'NEXT'. The website footer contains the copyright notice '© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.' and social media icons for Twitter, Facebook, and LinkedIn.

## まとめ

- TSCA Low Input kitは、アンプリコンのデザインから解析まで包括的なイリミナソリューションで実施可能
- Input DNA品質によっては最小10 ngから実施可能。FFPEサンプルにも対応。

## 参考データベース

- **TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit**

<http://jp.illumina.com/products/truseq-custom-amplicon-low-input.html>

- **DataSheet**

[http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_tru\\_seq\\_custom\\_amplicon\\_low\\_input.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_tru_seq_custom_amplicon_low_input.pdf)

- **Training**

[https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/truseq-custom-amplicon-low-input/training.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/truseq-custom-amplicon-low-input/training.html)

- **User Guide**

<https://support.illumina.com/downloads/truseq-custom-amplicon-low-input-library-prep-reference-guide-100000002191.html>

ご清聴ありがとうございました

本日セッション終了後のご質問は、  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)にお問い合わせください