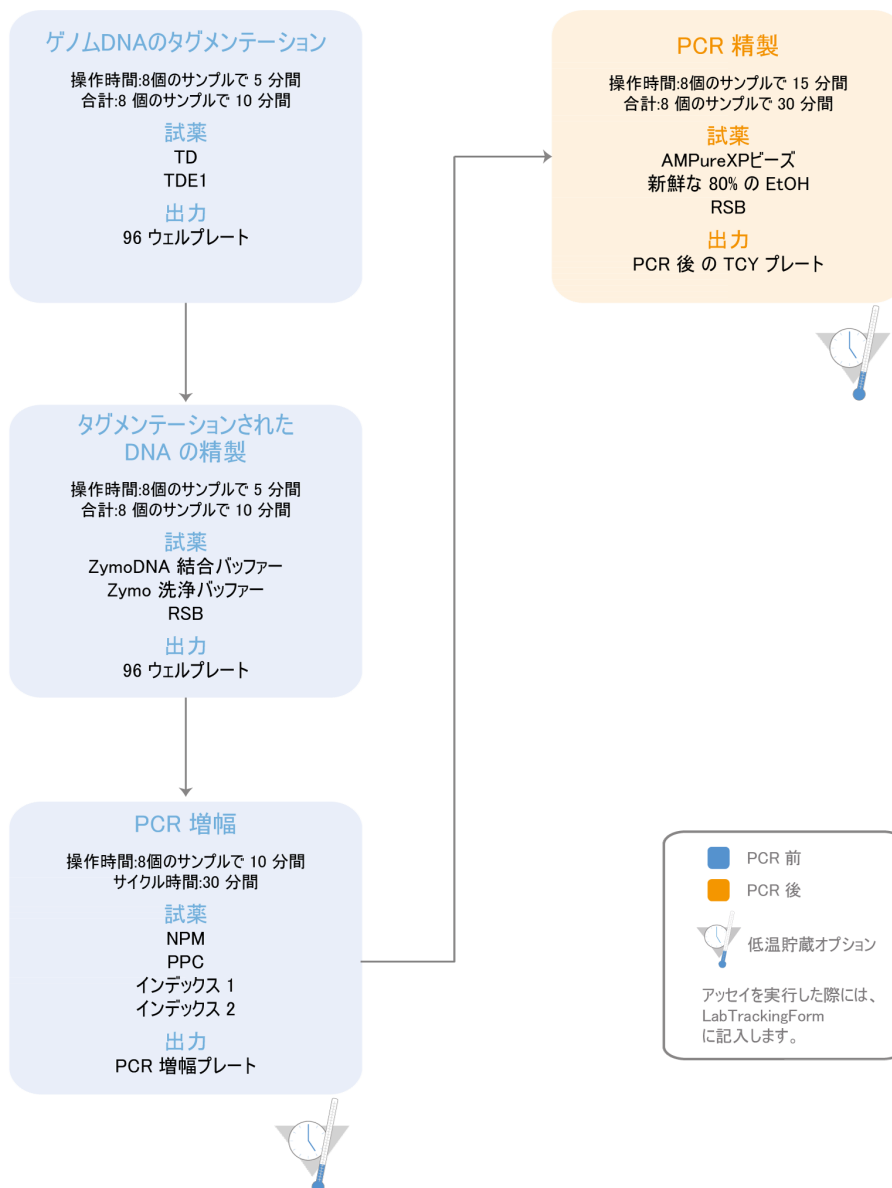


Experienced User Card

FOR RESEARCH USE ONLY



Tagmentation of Genomic DNA (ゲノム DNA のタグメンテーション)

このステップ中に、ゲノム DNA は、Nextera トランスポゾームによってタグメンテーション (タグ付けと断片化) されます。Nextera トランスポゾームは、ゲノム DNA の断片化と末端へのアダプター配列の付加を同時に行うため、続けて PCR による増幅ステップで可能になります。

推定時間 (8 反応)

- ▶ 操作時間 5 分間
- ▶ 総所要時間 10 分間

消耗品

アイテム	数量	ストレージ	提供元
TD (Tagment DNA Buffer)	1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
TDE1 (Tagment DNA Enzyme)	1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
ゲノム DNA (2.5ng/μl)		-15° ~ -25°C	ユーザー
96 ウェルハードシェル TCY プレート	1 プレート		ユーザー
マイクロシール「B」粘着フィルム			ユーザー

Preparation (調製)

- [] 1 TD、TDE1、およびゲノム DNA を -15° ~ -25°C の冷凍庫から取り出し、氷の上で解凍してください。
- [] 2 解凍後は、チューブを 3 ~ 5 回転倒混和し、遠心分離機で軽くスピンドアウンして、すべての試薬をよく混合してください。

Procedure (手順)



注意
最適なキットの性能を確実に得るため、反応が記載されている順番で実施されているか確認してください。反応を氷の上で行う必要はありません。

- [] 1 新しい 96 ウェル TCY プレートに、NSP1 とラベル付けします (Nextera Sample Plate 1)。
- [] 2 2.5ng/μl の濃度の 20μl ゲノム DNA (総量 50ng) を、NSP1 プレートの各サンプルウェルに添加します。
- [] 3 25μl の TD バッファーを、ゲノム DNA を含むウェルに添加します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意
全反応における TD の総量を計算し、8 ウェル PCR ストリップチューブ中の実際使用するチューブ数で割ります。マルチチャネルピペッターを使用して、NSP1 プレートに分注します。

- [] 4 5µl の TDE1 を、ゲノム DNA および TD バッファーを含むウェルに添加します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意

全反応における TDE1 の総量を計算し、8 ウェル PCR ストリップチューブ中の実際使用するチューブ数で割ります。マルチチャネルピペッターを使用して、NSP1 プレートに分注します。

- [] 5 マルチチャネルピペッターを使用して、上下に 10 回緩やかにピペティングして混合します。サンプルごとに、チップを交換してください。

- [] 6 マイクロシール「B」で TCY プレートのカバーします。

- [] 7 20°C、280xg で、1 分間遠心します。

- [] 8 サーマルサイクラーに TCY プレートを設置し、以下のプログラムを実行します。



注意

インキュベーションの間に、サーマルサイクラーのリッドのヒーターがオンになっているを確認してください。

- 55°C で 5 分間
- 10°C でホールドします。

Clean-Up of Tagmented DNA (タグメンテーションされた DNA の精製)

タグメンテーションされた DNA を、Nextera トランスポゾームから精製します。Nextera トランスポゾームは DNA 末端に結合することがあり、取り除かなかった場合は以降のプロセスに影響を与える可能性があるため、このステップは重要です。

推定時間 (8 反応)

- ▶ 操作時間 5 分間
- ▶ 総所要時間 10 分間

Consumables (消耗品)

アイテム	数量	ストレージ	提供元
RSB (Resuspension Buffer)	1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
Binding Buffer (Zymo DNA 結合バッファー)	1 本	室温	ユーザー
Zymo Wash Buffer (Zymo 洗浄バッファー (EtOH が添加されたもの))	1 本	室温	ユーザー
Zymo コレクションプレート	1 プレート	室温	ユーザー
96 ウェル ハードシェル TCY プレート	1 プレート		ユーザー
96 ウェル MIDI プレート	1 プレート		ユーザー

Preparation (調製)

- [] 1 RSB は、-15 ° ~ -25 °C の冷蔵庫から取り出し、室温で解凍してください。
- [] 2 手順セクションのステップ 1 と 2 は、タグメンテーション反応の進行中に実行してください。

Procedure (手順)

- [] 1 新しい MIDI プレートに、NSP2 とラベル付けします (Nextera Sample Plate 2)。
- [] 2 180µl の Zymo DNA Binding Buffer を、NSP1 プレートのウェルに対応する NSP2 プレートのサンプルの各ウェルに加えます。
- [] 3 NSP1 の各ウェルから 50µl を、アッセイで使用する NSP2 プレートの対応するウェルに移します。上下に 10 回緩やかにピペッティングして混合します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意
マルチチャンネルピペッターを使用したり、また Binding Buffer をリザーバーに添加する場合があります。

- ☐ 4 Zymo 精製キットから Zymo-Spin™ 1-96 プレートを取り出し、コレクションプレートの上に置きます。
 - ☐ 5 マルチチャネルピペッターを使用して、サンプル混合物を NSP2 プレートから、取り付けられた Zymo-Spin™ 1-96 プレートの対応するウェルに移します。
 - ☐ 6 20°C、1,300xg で、2 分間遠心します。フロースルーを破棄します。
- 

注意
遠心のステップで、プレートの積み重ねに適應できるように、Illumina は蓋なしのプレートホルダーを使用することを推奨します。
- ☐ 7 以下のとおりに、Zymo-Spin™ 1-96 プレートにて洗浄をしてください。
 - ☐ a マルチチャネルピペッターを使用して、リザーバーから 300µl の洗浄バッファーを各サンプルウェルに添加します。
 - ☐ b クロスコンタミネーションを避けるために、カラムごとにチップを交換してください。
 - ☐ c 20°C、1,300xg で、2 分間遠心します。フロースルーを破棄します。
 - ☐ 8 手順の 7 を繰り返して洗浄を 2 回行います。
 - ☐ 9 1,300xg で、2 分間遠心して、洗浄バッファーの残留物がないようにしてください。
 - ☐ 10 Zymo-Spin™ 1-96 プレートを、NSP とラベル付けされている新しい TCY プレートの上に置きます (Nextera Sample Plate)。
 - ☐ 11 25µl の RSB を、各ウェルのカラムマトリックスに直接添加します。
 - ☐ 12 プレートを室温で 2 分間インキュベートします。
 - ☐ 13 プレートを 20°C、1,300xg で、2 分間遠心します。

PCR Amplification (PCR 増幅)

このステップでは、精製されたタグメンテーション DNA が、少ないサイクルの PCR プログラムで増幅されます。また、PCR ステップでは、インデックス 1(i7) とインデックス 2(i5) およびシーケンスを付加するだけでなく、クラスター形成とシーケンスに必要な共通アダプター (P5 および P7) も付加します。高品質のシーケンス結果につながる高品質のライブラリーのためには、推奨されたインプット DNA の総量を使用し、また PCR サイクルに余分なサイクルを追加しないようにすることが重要です。

推定時間 (8 反応)

- ▶ 操作時間 10 分間
- ▶ スピン 30 分間
- ▶ 総所要時間 40 分間

消耗品

アイテム	数量	ストレージ	提供元
NPM (Nextera PCR Master Mix)	1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
PPC (PCR primer cocktail)	1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
インデックス 1 プライマー (N7XX)	各インデックスにつき、1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
インデックス 2 プライマー (N5XX)	各インデックスにつき、1 チューブ	-15° ~ -25°C	Illumina
TruSeq インデックスプレートフィクサー			Illumina
マイクロシール「A」粘着フィルム			ユーザー
96 ウェルハードシェル TCY プレート	1 プレート		ユーザー

Preparation (調製)

- [] 1 24 および 96 種類のライブラリーを 1 セットとしてプーリングとシーケンスをする場合は、手順 2 に進んでください。プーリングするシーケンスライブラリー数が 1 セットに満たない数の場合には、正しいインデックス 1(i7) とインデックス 2(i5) プライマーが選択されていることを確認してください。
『Nextera DNA サンプル調製ガイド』の最後にある「Dual Indexing and Low Plexity Pooling Guidelines」を参照し、Illumina Experiment Manager を使用して正しいインデックスプライマーが選択されていることを確認してください。
- [] 2 NPM、PPC、およびインデックスプライマーは、-15° ~ -25°C の冷蔵庫から取り出し、室温のベンチで解凍してください。
NPM、PPC およびインデックスプライマーが解凍するのに、およそ 20 分かかります。

- [] 3 すべての試薬が完全に解凍された後、各チューブを 3 ~ 5 回転倒混和して、チューブを遠心分離機で軽く遠心してください。遠心分離機のアダプターは、1.7ml のエッペンドルフチューブを使用してください。
- [] 4 ライブラリー数が 24 の場合、TruSeq インデックスプレートフィクサーでのインデックスプライマーの配置は、以下に従ってください。
 - [] a N701 がカラム 1 に、また N706 がカラム 6 になるように、インデックス 1(i7) プライマー (オレンジのキャップ) を、水平に順番に配置します。
 - [] b N501 が A 列に、N504 が D 列になるように、インデックス 2(i5) プライマー (白いキャップ) を垂直に順番に配置します。
 - [] c Lab Tracking Form に位置を記録します。
- [] 5 ライブラリー数が 96 の場合、TruSeq インデックスプレートフィクサーでのインデックスプライマーの配置は、以下に従ってください。
 - [] a N701 がカラム 1 に、また N712 がカラム 12 になるように、インデックス 1(i7) プライマー (オレンジのキャップ) を、水平に順番に配置します。
 - [] b N501 が A 列に、N508 が H 列になるように、インデックス 2(i5) プライマー (白いキャップ) を垂直に順番に配置します。
 - [] c Lab Tracking Form に位置を記録します。
- [] 6 新しい 96 ウェルマイクロプレートに、NAP1 とラベル付けします (Nextera Amplification Plate 1)。
- [] 7 マルチチャンネルピペッターを使用して、NAP1 プレートの各カラムにインデックス 2 プライマー (白いキャップ) の 5µl を添加します。クロスコンタミネーションを避けるために、カラムごとにチップを交換してください。
- [] 8 マルチチャンネルピペッターを使用して、NAP1 プレートの各列にインデックス 1 プライマー (オレンジのキャップ) の 5µl を添加します。インデックスのクロスコンタミネーションを避けるために、各列ごとにチップを交換してください。
- [] 9 インデックスのクロスコンタミネーションを避けるために、元の白いキャップを破棄し、キットのなかに用意されている新しい白いキャップを使用してください。
- [] 10 インデックスのクロスコンタミネーションを避けるために、元のオレンジのキャップを破棄し、キットのなかに用意されている新しいオレンジのキャップを使用してください。すべてのインデックスプライマーを作業場から取り除いてください。

Procedure (手順)

- [] 1 インデックスプライマーを含む NAP1 プレートの各ウェルに、15µl の NPM を添加します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意
全反応における NPM の総量を計算し、8 ウェル PCR ストリップチューブ中の実際使用するチューブ数で割ります。マルチチャンネルピペッターを使用して、NAP1 プレートに分注します。
- [] 2 インデックスプライマーおよび NPM を含む各ウェルに、5µl の PPC を添加します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意
全反応における PPC の総量を計算し、8 ウェル PCR ストリップチューブ中の実際使用するチューブ数で割ります。マルチチャンネルピペッターを使用して、NAP1 プレートに分注します。

- [] 3 マルチチャネルの P20 ピペットセットを使用して、以下のようにします。
 - NSP3 プレートからの 20 μ l の精製されたタグメンテーション DNA を NAP1 プレートの対応するウェルに移します。
 - 上下に 3 ~ 5 回緩やかにピペッティングして、DNA を PCR ミックスに混合します。インデックスおよびサンプルのクロスコンタミネーションを避けるために、サンプルごとにチップを交換してください。
- [] 4 プレートをマイクロシール「A」でカバーしてゴムのローラーで蓋をします。
- [] 5 20°C、280xg で、1 分間遠心します。
- [] 6 NAP1 プレートを、増幅後のエリアに移します。
- [] 7 サーマルサイクラーの以下のプログラムを使用して、PCR を実行してください。



注意

インキュベーションの間に、サーマルサイクラーのリッドのヒーターがオンになっているを確認してください。

- 72°C、3 分間
- 98°C、30 秒間
- 以下を、5 サイクル行なってください。
 - 98°C、10 秒間
 - 63°C、30 秒間
 - 72°C、3 分間
- 10°C、ホールド



SAFESTOPPING POINT

PCR の完了後に PCR 精製へと直ちに進まない場合は、そのプレートはサーマルサイクラーに 1 晩置いておくことができます。もしくは 2° ~ 8°C で、最長 2 日間保管することができます。

PCR Clean-Up (PCR 精製)

このステップは、AMPure XP ビーズを使用してライブラリー DNA を精製し、非常に短いライブラリー断片を母集団から取り除くサイズ選択ステップになります。

推定時間 (8 反応)

- ▶ 操作時間 15 分間
- ▶ 総所要時間 30 分間

消耗品

アイテム	数量	ストレージ	提供元
RSB (Resuspension Buffer)	1 チューブ	室温	Illumina
AMPure XP ビーズ			ユーザー
新しく用意した 80% エタノール			ユーザー
96 ウェル MIDI プレート	1 プレート		ユーザー
96 ウェル TCY プレート	1 プレート		ユーザー

Preparation (調製)

- [] 1 AMPure XP ビーズは室温に戻してください。
- [] 2 無水エタノールを調製して、新鮮な 80% エタノールを用意してください。



注意

洗浄の手順においては、常に新鮮な 80% エタノールを用意しておいてください。エタノールは空気中の水分を吸収するため、結果に影響を及ぼします。

Procedure (手順)

- [] 1 NAP1 プレートを 280xg で、1 分間 (20°C)、水滴を集めるために遠心します。
- [] 2 新しい MIDI プレートに、NAP2 (Nextera Amplification Plate2) とラベル付けします。
- [] 3 50µl に設定されたマルチチャンネルピペッターを使用して、PCR の産物を NAP1 プレートから NAP2 プレートへ移します。サンプルごとに、チップを交換してください。
- [] 4 ビーズが均等に分散されるように、30 秒間、AMPure XP bead をボルテックスします。リザーバーに適切な量のビーズを添加します。
- [] 5 マルチチャンネルピペッターを使用して、30µl の AMPure XP bead を NAP2 プレートの各ウェルに添加します。
- [] 6 上下に 10 回緩やかにピペティングします。



注意

あるいは、NAP2 プレートをマイクロプレートシェイカーで 1,800rpm、2 分間振盪することによって混合することもできます。

- ☐ 7 振盪せずに、室温で5分間インキュベートします。
- ☐ 8 磁気スタンドにプレートと2分間、または上清が透明になるまで置いておきます。
- ☐ 9 磁気スタンドにNAP2プレートを置いたまま、マルチチャンネルピペッターを使用して上清を注意深く取り除き、破棄します。サンプルごとに、チップを交換してください。



注意

何かの事情でチップにビーズが吸引されてしまった場合は、ビーズをプレートに戻して、プレートを磁気スタンドに2分間置き、上清が透明になったことを確認します。

- ☐ 10 磁気スタンドにNAP2プレートを置いたまま、新たに用意した80%のエタノールで、ビーズを以下のように洗浄してください。
 - ☐ a マルチチャンネルピペッターを使用して、200μlの新たに用意した80%のエタノールを各サンプルウェルに添加します。この段階では、ビーズを再懸濁しないでください。
 - ☐ b 磁気スタンドの上でプレートを30秒間、または上清が透明になるまでインキュベートします。
 - ☐ c 上清を注意深く取り除き、破棄します。
- ☐ 11 磁気スタンドの上にNAPプレートを置いたまま、以下のように2度目のエタノール洗浄を行なってください。
 - ☐ a マルチチャンネルピペッターを使用して、200μlの新たに用意した80%のエタノールを各サンプルウェルに添加します。
 - ☐ b 磁気スタンドの上でプレートを30秒間、または上清が透明になるまでインキュベートします。
 - ☐ c 上清を注意深く取り除き、破棄します。
 - ☐ d 細いピペットチップのP20マルチチャンネルピペッターを使用して、余剰のエタノールを取り除きます。
- ☐ 12 NAP2プレートを磁気スタンドに置いたまま、ビーズを15分間空気乾燥させます。
- ☐ 13 磁気スタンドからNAP2プレートを取りはずします。マルチチャンネルピペッターを使用して、32.5μlのRSBをNAP2プレートの各ウェルに添加します。
- ☐ 14 チップをカラムごとに交換しながら、上下に10回緩やかにピペッティングします。



注意

あるいは、NAP2プレートをマイクロプレートシェイカーで1,800rpm2分間振盪することによって混合することもできます。

- ☐ 15 室温で2分間インキュベートします。
- ☐ 16 磁気スタンドの上にプレートを2分間、または上清が透明になるまで置いておきます。
- ☐ 17 新しいTCYプレートに、NLP (Nextera Library Plate) とラベル付けします。
- ☐ 18 マルチチャンネルピペッターを使用して、注意深く30μlの上清をNAP2プレートからNLP2プレートに移します。クロスコンタミネーションを避けるために、サンプルごとにチップを交換してください。

Validate Library (ライブラリーの確認)

サンプルライブラリーでの品質管理分析とDNA ライブラリーテンプレートの定量化に対して以下の手順を実行することを、Illumina では強く推奨します。

Quantify Libraries (ライブラリーの定量)

Illumina のシーケンスプラットフォームで最高品質のデータを取得するには、すべてのフローセルのすべてのレーンにわたって最適なクラスター密度を実現させることが重要です。これには、DNA ライブラリーテンプレートの正確な定量化が必要とされます。Qubit または PicoGreen など、dsDNA 特有の蛍光色素方法を使用して、ライブラリーを定量してください。ライブラリーの平均サイズ 500bp に基づき、計算式 $1\text{ng}/\mu\text{l} = 3\text{nM}$ を使用してライブラリー濃度を変換してください。

Quality Control (品質管理)

1:3 で希釈された $1\mu\text{l}$ のライブラリーを、High Sensitivity DNA Chip を用いた Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer で実行することによって、一部または全ライブラリーのサイズ分布を確認することを推奨します。典型的なライブラリーは、中心が 400～500 bp にある 250～1,000bp のサイズ分布を示します。平均のライブラリーのサイズが 500bp から大きく異なる場合は、計算式 $1\text{ng}/\mu\text{l} = 3\text{nM} \div (\text{ライブラリー平均サイズ (bp)} / 500)$ に照らして、DNA 濃度を調節してください。1 kb 以上のライブラリーの平均サイズの場合、幾つかの濃度でクラスター密度を最適化する必要がある場合があります。

Pool Libraries (ライブラリーのプール)

このプロセスでは、クラスター形成に適用される DNA テンプレートの調製方法が説明されます。マルチプレックスが行われる DNA ライブラリーは、Nextera Dilution プレートで 4nM にノーマライズされ、Nextera Pooled プレートで等しい量にプールされます。マルチプレックスを行わない DNA ライブラリーは、プールなしで Nextera Dilution プレートで 4nM にノーマライズしてください。

消耗品

アイテム	数量	ストレージ	提供元
NDP (Nextera Dilution Plate) バーコードラベル	1		Illumina
NPP (Nextera Pooled Plate) バーコードラベル (マルチプレックスを行う場合のみ)	1		Illumina
マイクロシール「B」粘着フィルム			ユーザー
Tris-Cl 10 mM, pH8.5, 0.1% Tween20		-15° ~ -25°C	ユーザー
96 ウェル MIDI プレート	2 プレート		ユーザー

調製

- ▶ NDP バーコードラベルを新しい 96 ウェル MIDI プレートに貼ります。
- ▶ NPP バーコードラベルを新しい 96 ウェル MIDI プレートに貼ります (マルチプレックスを行う場合のみ) 。
- ▶ PCR 精製の終わりで NLP プレートを保管した場合は、それを -15° ~ -25°C の冷蔵庫から取り出し、室温で置いたままにして解凍します。
 - 解凍された NLP プレートを一時的に 280xg で 1 分間遠心します。
 - 解凍された NLP プレートから粘着シールを取り除きます。

Make NDP (NDP 作成)

- ☐ 1 NDP プレートの各ウェルから 10µl のサンプルライブラリーを、NDP バーコードでラベル付けされた新しい MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- ☐ 2 NDP プレートの各ウェルにあるサンプルライブラリーの濃度を、Tris-Cl 10mM (pH 8.5)、0.1% Tween20 を使用して、4nM にノーマライズします。
- ☐ 3 以下のように NDP プレートを混ぜます。
 - ☐ a マイクロシール「B」粘着シールで NDP プレートを密封します。
 - ☐ b NDP プレートをマイクロプレートシェーカーで、1,000rpm で 2分間振盪します。
 - ☐ c NDP プレートを 280xg で 1 分間遠心します。
 - ☐ d 粘着シールを NDP プレートから取り除きます。

- [] 4 生成するライブラリーに応じて、以下から 1 つを実行します。
- マルチプレックスを行わないペアエンドライブラリーでは、プロトコールはここで終了です。以下から 1 つを実行します。
 - クラスター形成に進みます。『Illumina クラスター形成ユーザガイド』を参照します。
 - マイクロシール「B」粘着シールで NDP プレートを実行を密封し、-15° ~ -25°C で保管します。
 - マルチプレックスを行いたいペアエンドライブラリーでは、NPP 作成に進みます。

Make NPP (for multiplexing only) (NPP 作成 (マルチプレックスを行う場合のみ))

- [] 1 マルチチャンネルピペッターを使用して、NDP プレートのカラム 1 における各サンプル 5µl を、NPP プレートのカラム 1 に移します。
- [] 2 チップを交換して、NDP プレートのカラム 2 における各サンプル 5µl を、NPP プレートのカラム 1 に移します。
- [] 3 手順の 2 を、NDP プレートで残っているカラムの数だけ繰り返します。カラムごとに、チップを交換してください。NPP プレートのカラム 1 にサンプルがプールされた状態になります。
- [] 4 最終的なプールでは、カラム 1 の各ウェルの内容物を、NPP プレートの A2 ウェルに混合します。
- [] 5 以下のように、NPP プレートを混ぜます。
- [] a マイクロシール「B」粘着シールで、NDP プレートを密封します。
 - [] b NPP プレートをマイクロプレートシェーカーで、1,800rpm で 2 分間振盪します。
- [] 6 以下から 1 つを実行します。
- クラスター形成に進む。『Illumina クラスター形成ユーザガイド』を参照します。
 - マイクロシール「B」粘着シールで NPP プレートを密封し、-15° ~ -25°C で保管します。

