

進化したNextera DNA Flexを用いたライブラリー調製

フィールドアプリケーションサイエンティスト

大出 明

2018/10/31



© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiniSeq, 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

Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー

1. Nextera DNA Flexライブラリー調製キットの紹介

2. DNA試料の準備

- 注意点、必要量、品質確認

3. ライブラリー調製

- 関連製品および準備品
- Nextera DNA Flex調製方法

4. ライブラリー評価、シーケンス条件

- ライブラリーの定量と定性
- ローディングDNA濃度、リード長

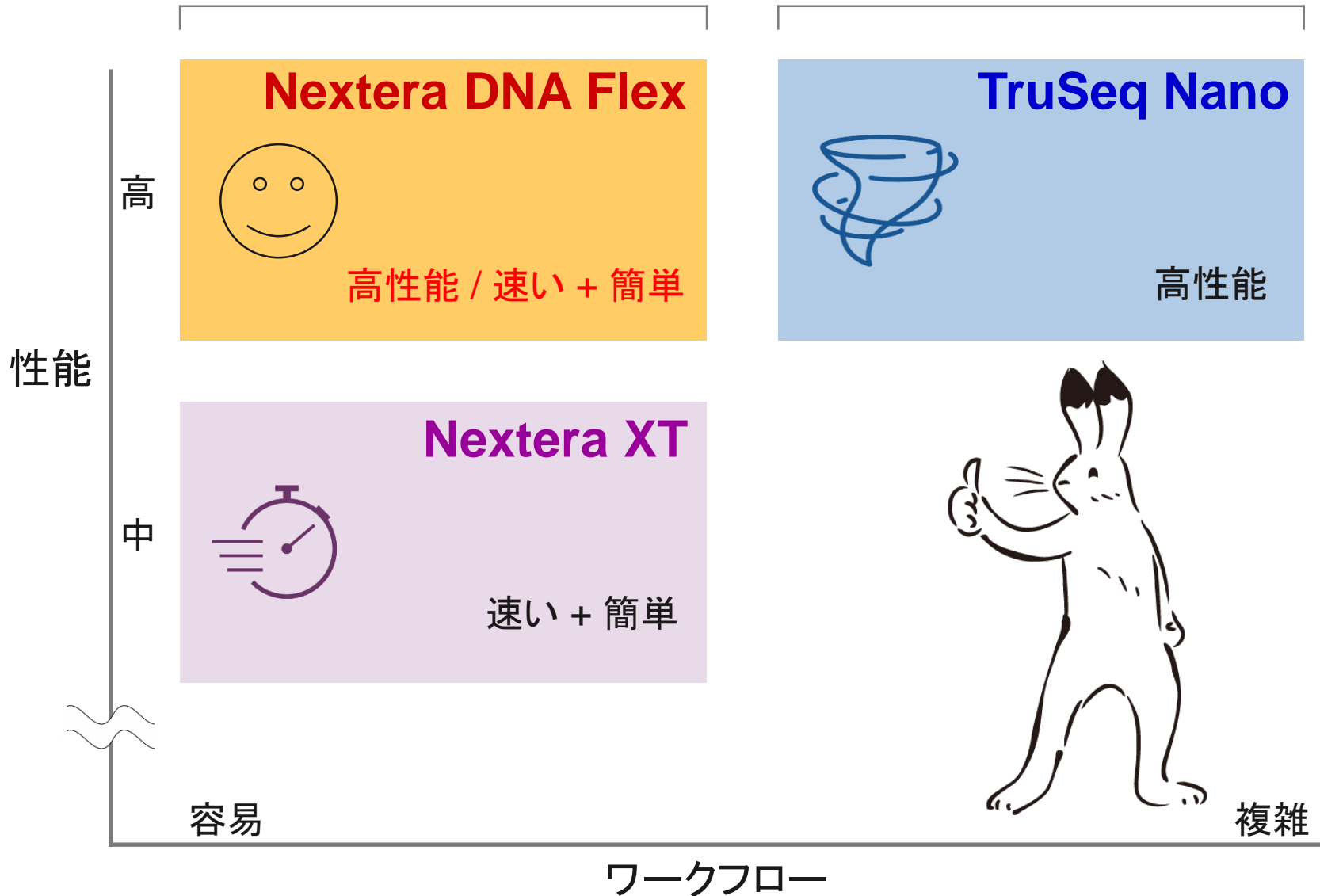
5. まとめ

- ライブラリー調製のポイント
- トラブルシュート

イルミナDNAライブラリー調製キット

酵素による断片化

機械による断片化



DNAライブラリー調製法の課題

全ゲノムライブラリー調製

課題

DNA試料の調製	物理的DNA断片化 (TruSeq法)	酵素法DNA断片化 (従来のNextera法)	ライブラリーQC
DNA抽出、 精製、定量	断片化装置が必要、 煩雑な作業	切断時のbiasの影響	定量、サイズ確認 ノーマライゼーション



解決策

Nextera™ DNA Flex
Library Prep Kit

多様なサンプルから、素早く、高品質なライブラリーを簡便に調製できる

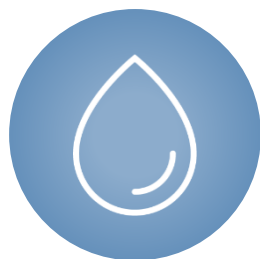
多様なサンプルに対応

ゲノムDNA、血液、唾液、微生物



gDNA

1 – 500 ng DNAから
調整可能



血液*

10 ulの非凍結全血から
調製可能

*Flex Lysis Reagent Kit
と組み合わせて利用



血液パンチカード

5 x 3 mm²のDBS card
から調製可能

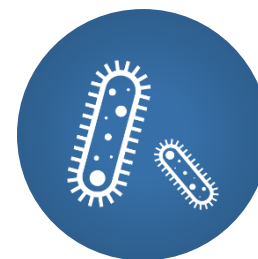
検証済みプロトコルを
サポートページで公開



唾液**

30 ulの熱処理済み唾液
から調製可能

**Oragene Saliva
Collection Kit
と組み合わせて利用



微生物コロニー

白金耳で採取した10 uL
の培地から調製可能

検証済みプロトコルを
サポートページで公開



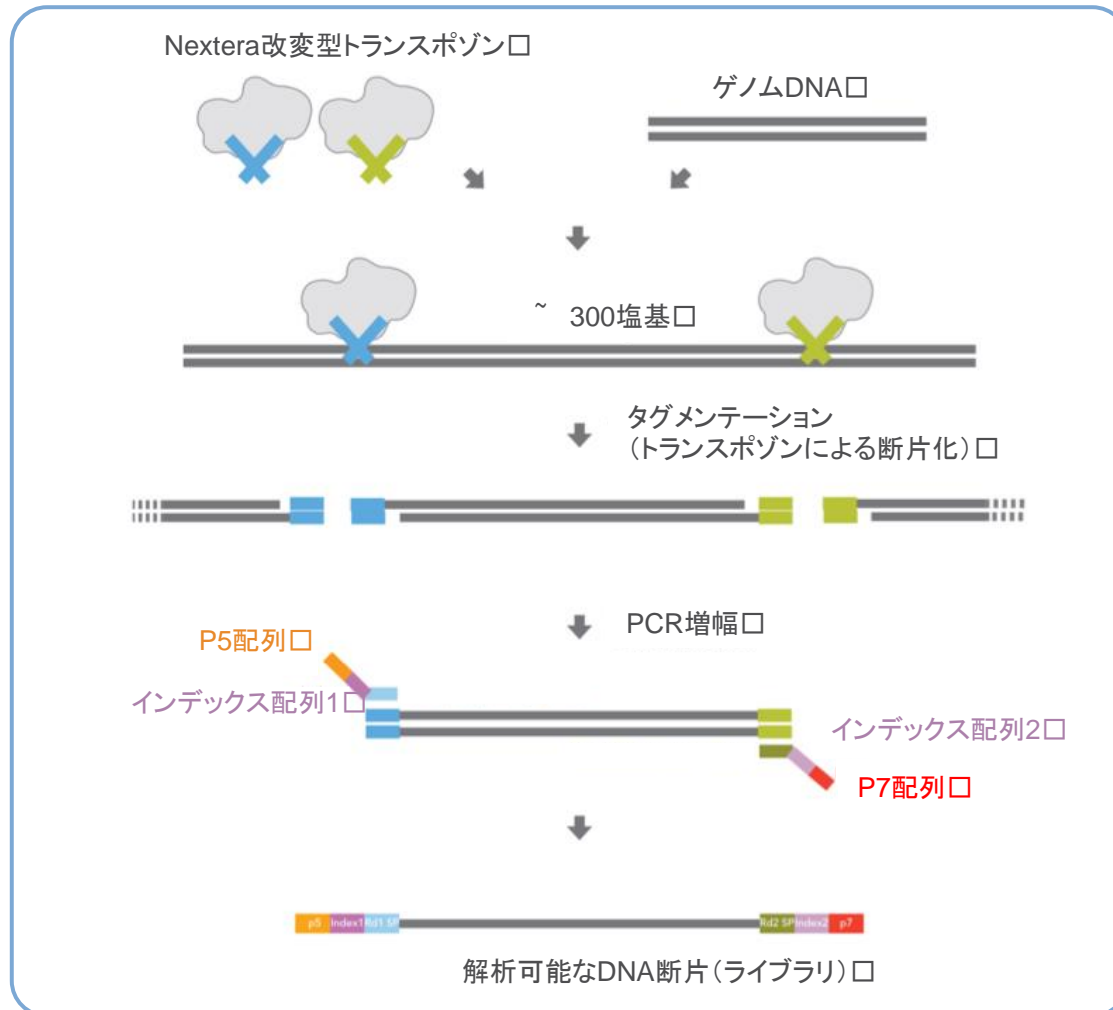
DNA抽出後の定量操作が不要

イルミナサポートページ

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera-dna-flex-kit/documentation.html

酵素法DNA断片化を利用したライブラリー調製

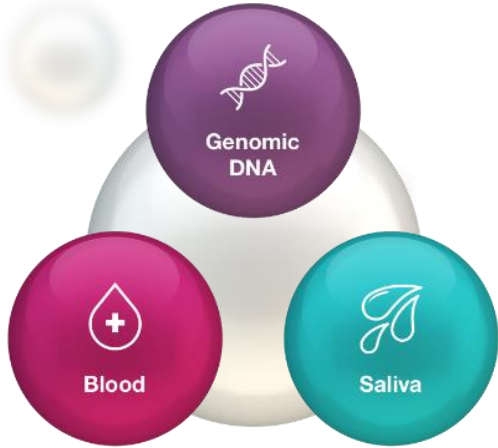
Nextera XTの場合



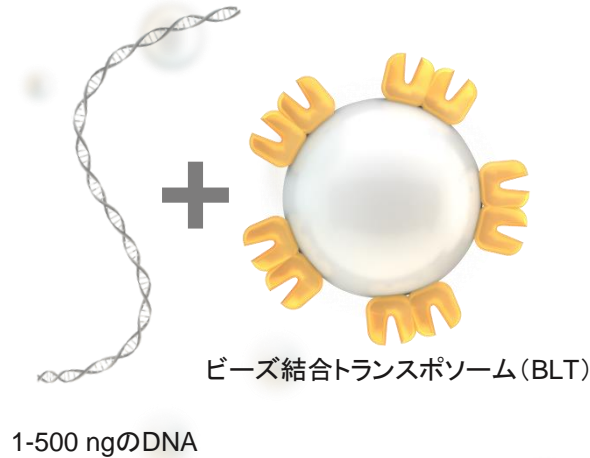
Nextera™ DNA Flex Library Prep

ワークフローの概要

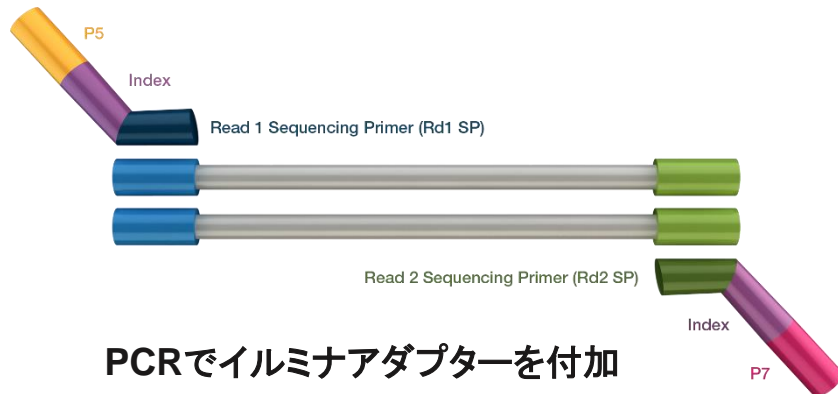
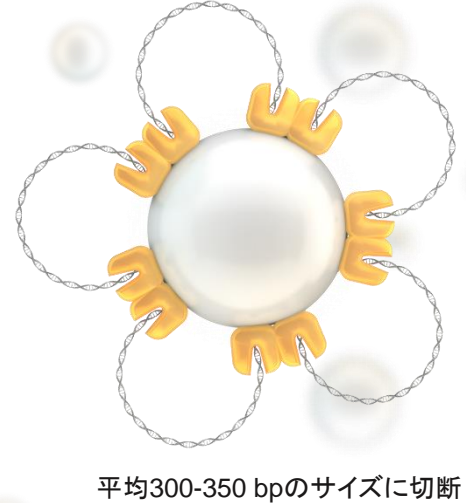
DNAを単離、精製



DNAとBLTを混合



DNAの切断、タグメンテーション



磁気ビーズによる精製後、ライブラリーの完成

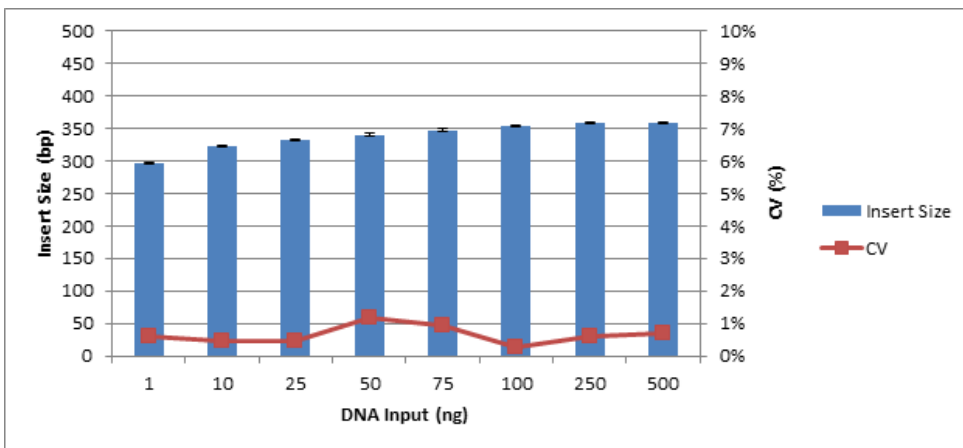
イルミナDNAライブラリー調製キットの比較

	Nextera DNA Flex		TruSeq Nano	Nextera XT
	体液	Large Genome ※		
出発材料	血液、唾液、微生物コロニー	DNA < 100 ng	DNA 100 - 200 ng	DNA 1 ng
DNA試料の定量	不要	必要	必要	必要
断片化装置	不要	不要	必要	不要
ノーマライゼーション	試料状況次第	不要	必要	必要
ライブラリーインサートサイズ		300 - 350 bp		350 bp 550 bp
ライブラリDNAのPooling時の定量	試料状況次第	必要	必要	不要
トータルワークフロー	3.5 時間 (DNA抽出含む)	3.0 時間 + DNA抽出・定量 1.5 時間	9.5 時間 + DNA抽出・定量 1.5 時間	4.0 時間 + DNA抽出・定量 1.5 時間

※ ウィルスなどのSmall Genomeの場合は、DNA 1ngを使用する

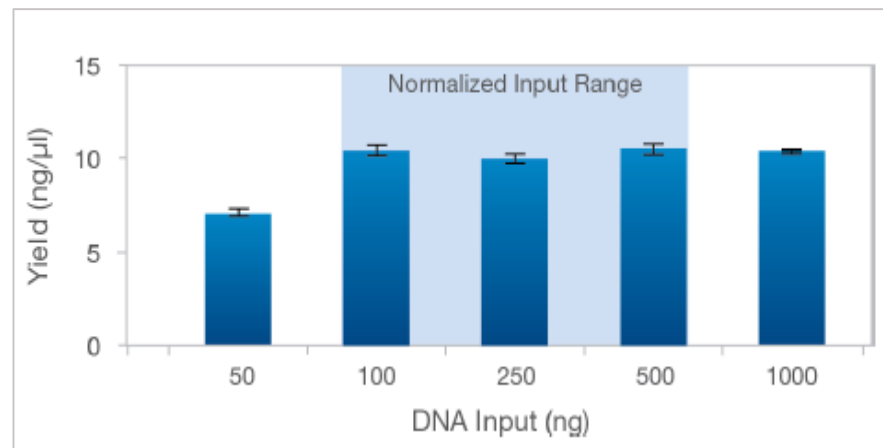
BLTを使用したタグメンテーションの利点

安定したインサートサイズとライブラリー収量



幅広いDNA使用量に対して、
均質なインサートサイズを実現

1~500ng gDNA使用



十分なDNA使用量において、
一定のライブラリー収量を実現

100~500ng gDNA使用

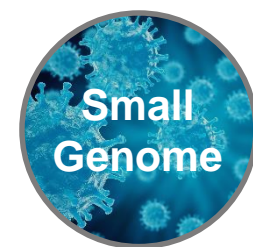
血液、唾液、乾燥血液、

細菌コロニーのプロトコール使用時

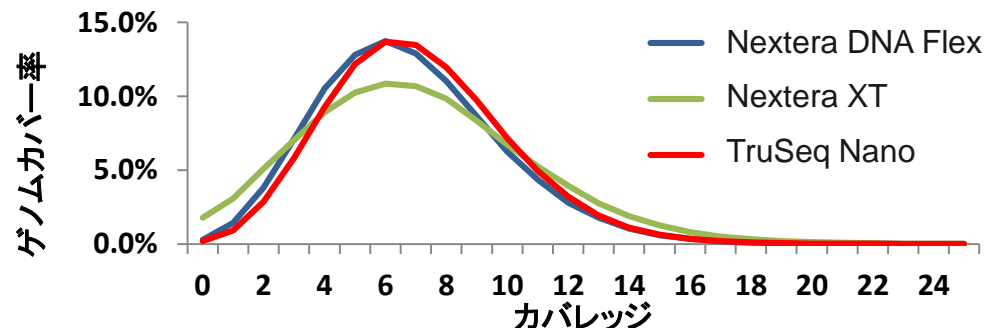
DNA試料の厳密な定量、および
ライブラリー調整後のノーマライゼーションが不要に

性能比較

バクテリアゲノムカバー率

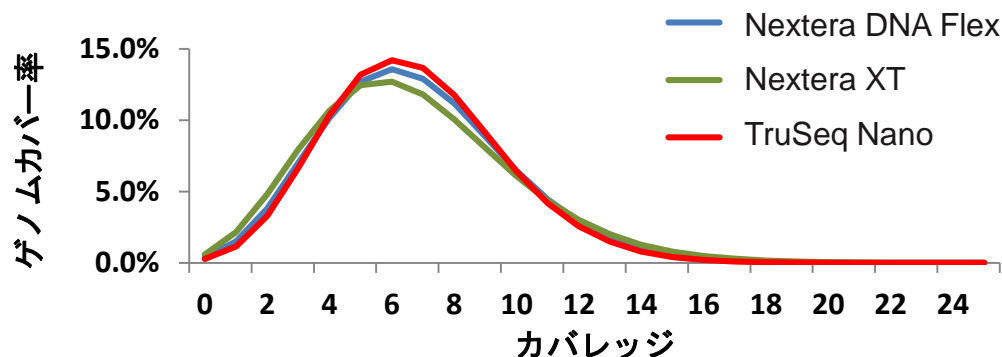


A.baumannii のゲノムカバレッジプロファイル (GC含量=39%)



	Nextera DNA Flex	Nextera XT	TruSeq Nano
カバレッジ標準偏差	2.8	3.2	2.9
ゲノム非カバー率	0.3%	1.8%	0.2%
ゲノムカバー率 (<3x)	5.5%	10.0%	4.0%

P.aeruginosa のゲノムカバレッジプロファイル (GC含量=66%)



	Nextera DNA Flex	Nextera XT	TruSeq Nano
カバレッジ標準偏差	3.0	3.4	2.9
ゲノム非カバー率	0.4%	0.6%	0.3%
ゲノムカバー率 (<3x)	5.7%	7.5%	4.7%

Nextera XTのカバー率はGC含量の影響を受けたが、
Nextera DNA Flexは影響を受けにくい

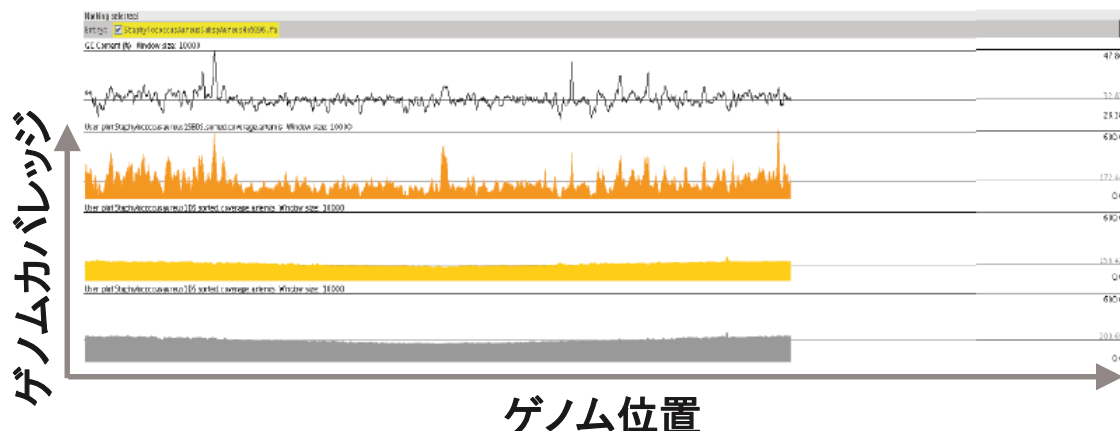


性能比較

カバレッジの均一性

黄色ブドウ球菌

GC含量 = 32.8%



→ GC contents

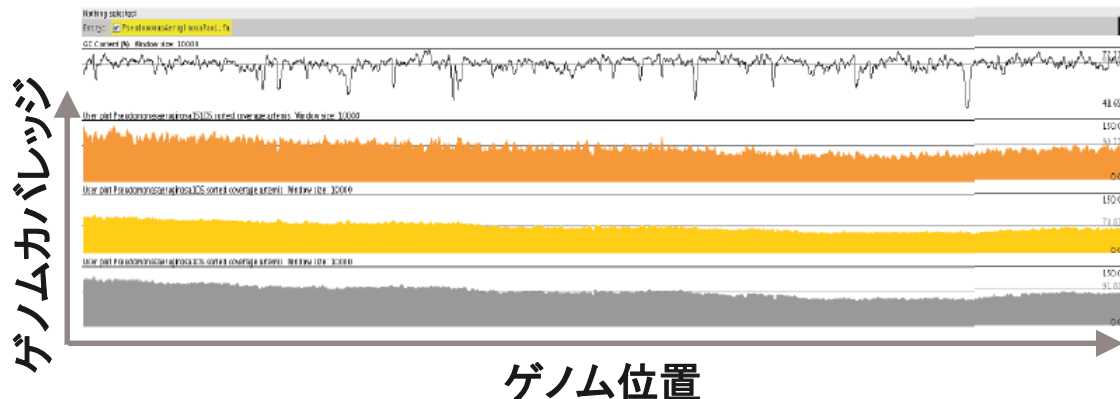
→  Nextera XT (1 ng)

→  Nextera DNA Flex (1 ng)

→  Nextera DNA Flex (200 ng)

緑膿菌

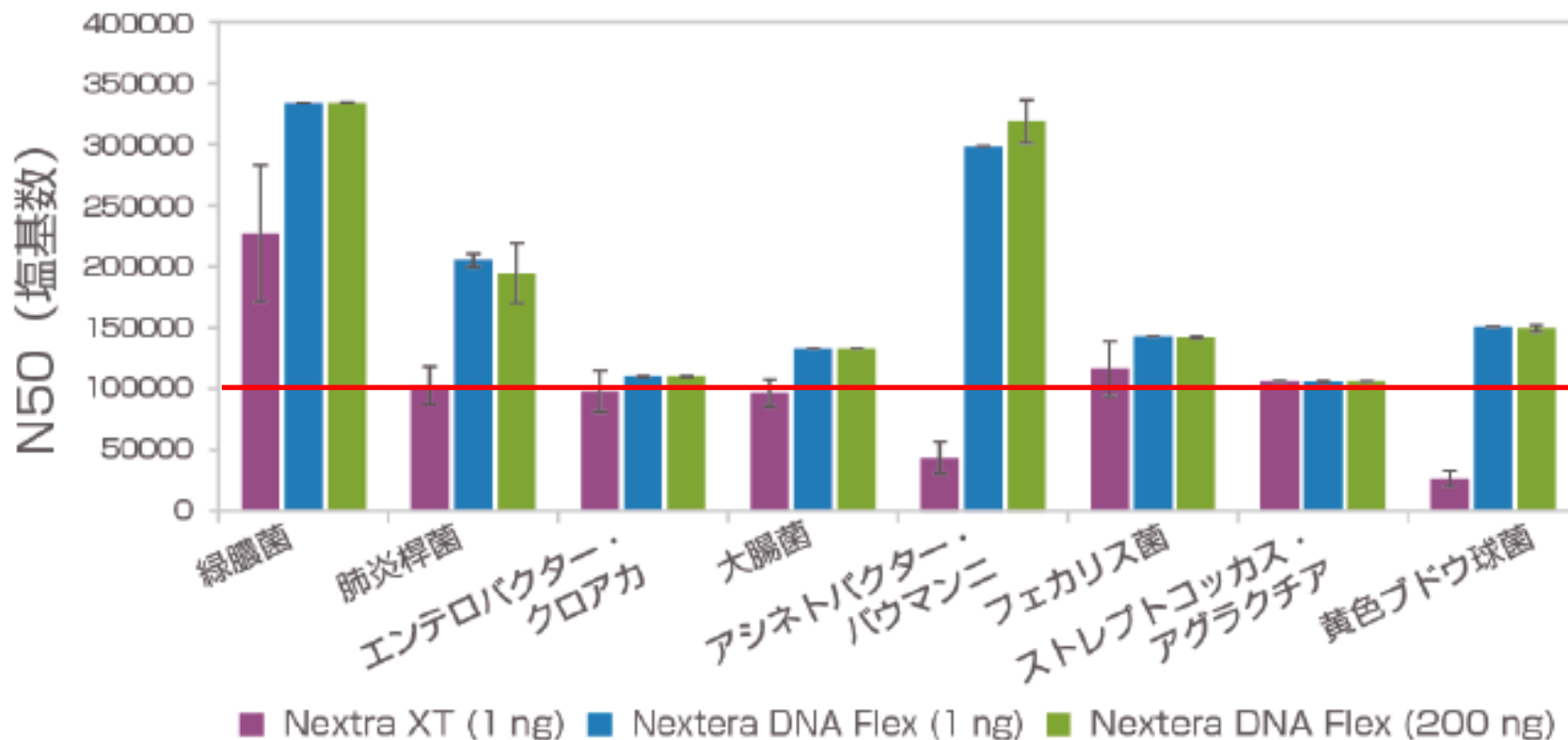
GC含量 = 66.5%



Nextera DNA Flexは、高ATおよび高GCのゲノムDNAでも、
均一なカバレッジを得ることが可能

性能比較

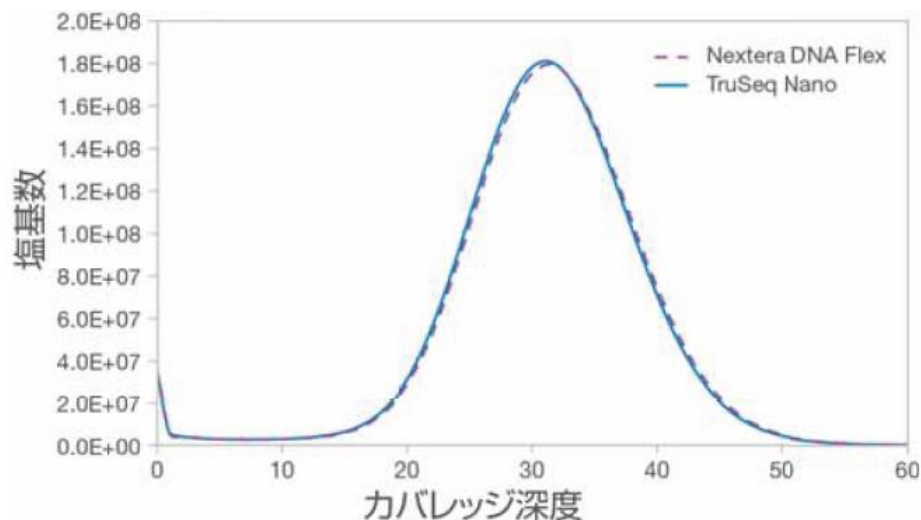
コンティグ長の比較



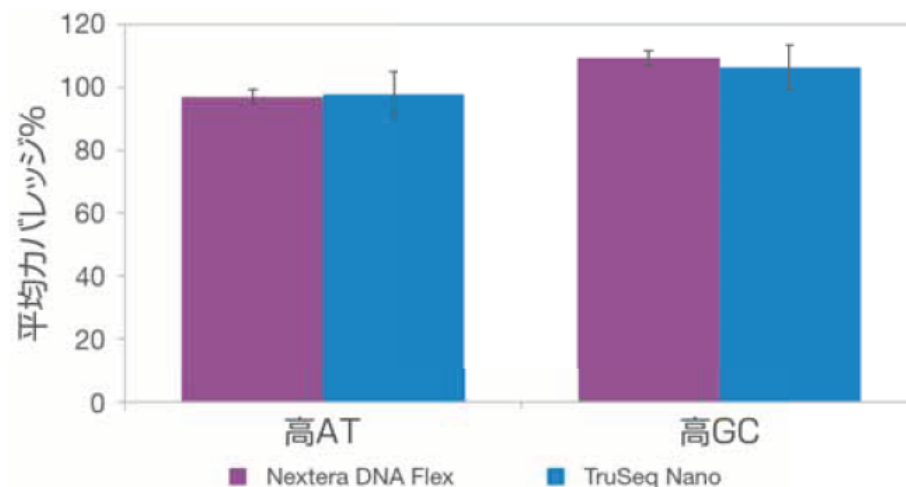
Nextera DNA Flexは、高ATおよび高GCのゲノムDNAでも、長いコンティグを得ることが可能

性能比較

ゲノムカバー率



ヒト全ゲノムのカバレッジの均一性



高ATおよび高GC領域のカバレッジ

Nextera DNA Flexは、ヒトゲノムの解析においても
TruSeq Nanoと同じく良好な結果が得られる

☆ Nextera Flex for Enrichment

- ✓ FFPEを含む様々なサンプルから、簡便かつ迅速に、均質なライブラリーを作成するための製品です。
- ✓ これまでのエクソーム製品やTruSightOneなどのパネル製品だけでなく、IDTやTwistといった他社製品パネルや濃縮系のカスタム製品も使用することができます。

製品番号	製品名	希望販売価格
20025523	Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep and Enrichment Reagents 16 samples (16, 1-plex enrichment reactions)	616,000円
20025524	Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep and Enrichment Reagents 96 samples (8, 12-plex enrichment reactions)	1,430,000円
20025519	Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep Reagents (16 samples)	135,000円
20025520	Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep Reagents (96 samples)	705,000円

2018年10月の価格となります

Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー

1. Nextera DNA Flexライブラリー調製キットの紹介

2. DNA試料の準備

- 注意点、必要量、品質確認

3. ライブラリー調製

- 関連製品および準備品
- Nextera DNA Flex調製方法

4. ライブラリー評価、シーケンス条件

- ライブラリーの定量と定性
- ローディングDNA濃度、リード長

5. まとめ

- ライブラリー調製のポイント
- トラブルシュート

DNA試料の準備

- ✓ EDTAなどの夾雑物がTagmentation反応を阻害するため、溶出液には、Nuclease-free Water、または、10 mM Tris-HCl(pH8.5)の使用を推奨。液量は30 ul必要。
- ✓ 抽出したDNAは、分光光度計にて吸光度を測定し、精製度を確認する。
260/280 Ratio : 1.8 – 2.0 および 260/230 Ratio : 2.0 – 2.2
- ✓ 100 – 500 ngのDNA試料を反応に使用する場合は、厳密な測定は必要ない。PCR cycle数は一定である。
- ✓ 微量のDNA試料(1-100 ng)を反応に使用する場合は、PCR cycle数を決定するために、蛍光定量法にてDNA量を正確に測定する（分光光度計による測定結果は、値にバラツキが生じる）。
- ✓ Reference Guide (part#1000000025416)には、血液・唾液からのDNA抽出プロトコルが記載されている。生体試料からの抽出には、一般的なカラム抽出が望ましい。
 <抽出キット例> : QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
- ✓ サポートページにて、血液パンチカード、微生物コロニー、菌叢解析のDNA抽出プロトコル(それぞれpart#1000000035294、35296、57812) を公開している。

Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー

1. Nextera DNA Flexライブラリー調製キットの紹介
2. DNA試料の準備
 - 注意点、必要量、品質確認
3. ライブラリー調製
 - 関連製品および準備品
 - Nextera DNA Flex調製方法
4. ライブラリー評価、シーケンス条件
 - ライブラリーの定量と定性
 - ローディングDNA濃度、リード長
5. まとめ
 - ライブラリー調製のポイント
 - トラブルシュート

Nextera DNA Flex Library Prep 関連製品

DNA抽出

ライブラリー調製

インデックス

**Flex Lysis
Reagent Kit**
(血液用)



**Nextera DNA Flex
Library Prep**



**Nextera DNA CD
Index Kit**



カタログ 番号	製品名	試料あたりの 単価	希望販売価格
20018706	Flex Lysis Reagent Kit (96 Samples)	525円	50,400円
20018704	Nextera DNA Flex Library Prep (24 Samples)	7,375円	177,000円
20018705	Nextera DNA Flex Library Prep (96 Samples)	7,344円	705,000円
20018707	Nextera DNA CD* Indexes (24 Indexes, 24 Samples)	875円	21,000円
20018708	Nextera DNA CD* Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	874円	83,900円

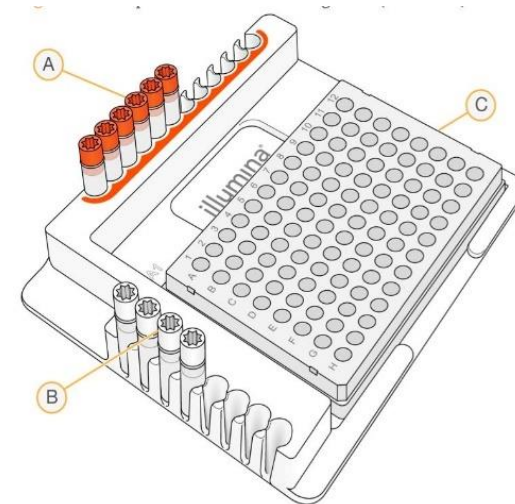
*CD: Combinational Dual

2018年10月の価格となります

Nextera DNA CD Indexes

24パターンのデュアルインデックス

- ▶ 24デュアルインデックスライブラリー
- ▶ チューブフォーマット (4 + 6 index)
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture Kit(別売り)が便利



	Index Name	Bases in Adapter	Bases for Sample Sheet	Type
A	H503	TATCCTCT	AGAGGATA	i5
	H505	GTAAGGAG	CTCCTTAC	i5
	H506	ACTGCATA	TATGCAGT	i5
	H517	GCGTAAGA	TCTTACGC	i5
B	H705	CGTCTAAT	ATTAGACG	i7
	H706	TCGACTAG	CTAGTCGA	i7
	H707	CCTAGAGT	ACTCTAGG	i7
	H710	GCGTAAGA	TCTTACGC	i7
	H711	TTATGCGA	TCGCATAA	i7
	H714	TCGCCTTA	TAAGGCGA	i7

Nextera DNA CD Indexes

96パターンのデュアルインデックス

- ▶ 96デュアルインデックスライブラリー
- ▶ プレートフォーマット (8 x 12 index)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H505-H701	H506-H702	H517-H703	H505-H705	H506-H707	H517-H723	H505-H706	H506-H712	H517-H720	H505-H710	H506-H711	H517-H714
B	H517-H702	H505-H703	H506-H701	H517-H707	H505-H723	H506-H705	H517-H712	H505-H720	H506-H706	H517-H711	H505-H714	H506-H710
C	H506-H703	H517-H701	H505-H702	H506-H723	H517-H705	H505-H707	H506-H720	H517-H706	H505-H712	H506-H714	H517-H710	H505-H711
D	H503-H705	H503-H707	H503-H723	H503-H706	H503-H712	H503-H720	H503-H710	H503-H711	H503-H714	H503-H701	H503-H702	H503-H703
E	H516-H706	H516-H712	H516-H720	H516-H710	H516-H711	H516-H714	H516-H701	H516-H702	H516-H703	H516-H705	H516-H707	H516-H723
F	H522-H710	H510-H711	H513-H714	H522-H701	H510-H702	H513-H703	H522-H705	H510-H707	H513-H723	H522-H706	H510-H712	H513-H720
G	H513-H711	H522-H714	H510-H710	H513-H702	H522-H703	H510-H701	H513-H707	H522-H723	H510-H705	H513-H712	H522-H720	H510-H706
H	H510-H714	H513-H710	H522-H711	H510-H703	H513-H701	H522-H702	H510-H723	H513-H705	H522-H707	H510-H720	H513-H706	H522-H712

ライブラリー調製 必要準備品

- Nextera DNA Flex Library Prep

Box #	略称	名称	保管温度
1	SPB ※	Sample Purification Beads	冷蔵
1	TSB	Tagment Stop Buffer	冷蔵→室温
1	TWB	Tagment Wash Buffer	冷蔵→室温
2	RSB	Resuspension Buffer	冷凍
2	TB1	Tagmentation Buffer 1	冷凍
2	EPM	Enhanced PCR Mix	冷凍
3	BLT	Bead-Linked Transposomes	冷蔵

※ Reference guide(1000000025416 v02)では、一部で「PB」と表記されています

- Nextera DNA CD Indexes

名称	形式	保管温度
24 Dual Index (Tube Format)	i5 : 4本 & i7 : 6本	冷凍
96 Dual Index (Plate Format)	96 plate(i5, i7混合済み)	冷凍

血液・唾液等からの抽出プロトコルは、ユーザーガイドやサポートページをご参照ください。

ライブラリー調製 必要準備品

- 器具・装置

#	製品名	製造販売元	型番	備考
1	マイクロピペット（シングル） 20, 200, 1000 ul	メーカー指定なし		
2	マイクロピペット（8連） 20, 200 ul	メーカー指定なし		オプション
3	96ウェル専用マグネットスタンド	Thermo Fisher	AM10027	※1
4	蛍光定量装置 (Qubit Fluorometer 4.0)	Thermo Fisher	Q33226	同等品可
5	分光光度計	メーカー指定なし		
6	電気泳動装置 (Agilent 2100 Bioanalyzer)	Agilent	G2940CA	同等品可
7	マイクロプレート遠心機	メーカー指定なし		※2
8	遠心機	メーカー指定なし		
9	Vortexミキサー	メーカー指定なし		
10	サーマルサイクラー（ヒートリッド付）	Bio-Rad	C-1000 Touch	左記の機器は推奨設定あり 同等品可
		Eppendorf	MasterCycler Pro	

※1 少数の場合、1.5 ml用のマグネットスタンドでも代用可能（日本ジェネティクス FG-SSMAG1.5等）

※2 PCRプレート対応製品（必要に応じてMIDIプレート搭載可能な製品を使用）

血液・唾液等からの抽出プロトコルは、ユーザーガイドやサポートページをご参照ください。

ライブラリー調製 必要準備品

- 試薬・消耗品

#	製品名	製造販売元	型番	備考
1	Ethanol (absolute) for molecular biology	Sigma-Aldrich	E7023	同等品可
2	Nuclease-free water	メーカー指定なし		
3	96-well storage plates, round well 0.8 ml (midi plate)	Thermo Fisher	AB-0859	※1、※2
4	96-well PCRプレート	メーカー指定なし		サーマルサイクラー推奨品
5	PCRプレートシール(PCR用)	メーカー指定なし		サーマルサイクラー推奨品
6	PCRプレートシール(保存用)	Bio-Rad	MSB-1001	同等品可
7	フィルター付きピペットチップ 10, 20, 200, 1000 ul	メーカー指定なし		マイクロピペット推奨品
8	RNase/DNase-free multichannel reagent reservoirs, disposable	VWR	9094-658	同等品可
9	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent	5067-1504	電気泳動装置推奨品
10	Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher	Q32850 Q32853	蛍光定量装置推奨品
11	Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher	Q32856	蛍光定量装置推奨品

※1 高さ3cm程度の96プレート

※2 少数の場合、1.5 ml エッペンドルフチューブで代用可能

血液・唾液等からの抽出プロトコルは、ユーザーガイドやサポートページをご参照ください。

Nextera DNA Flex調製方法

Step 1 : DNAの断片化
(1.0時間)



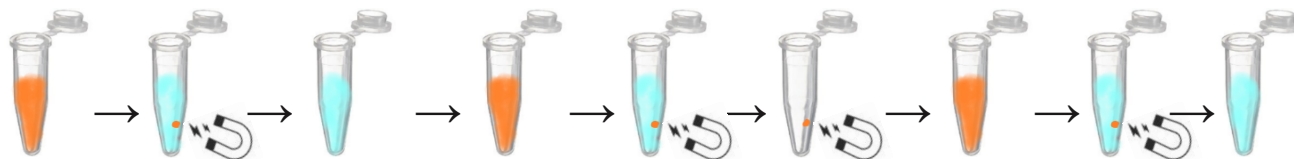
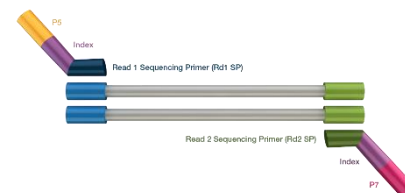
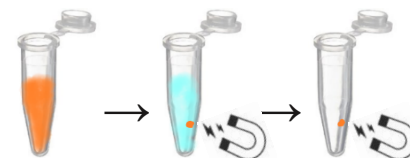
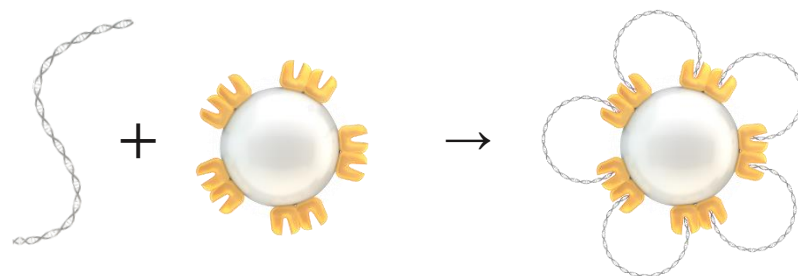
Step 2 : 断片化DNAの精製
(0.3時間)



Step 3 : 断片化DNAの増幅
(1.0時間)

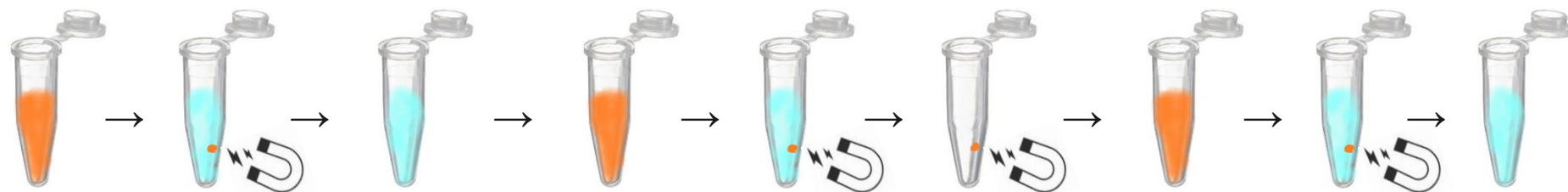
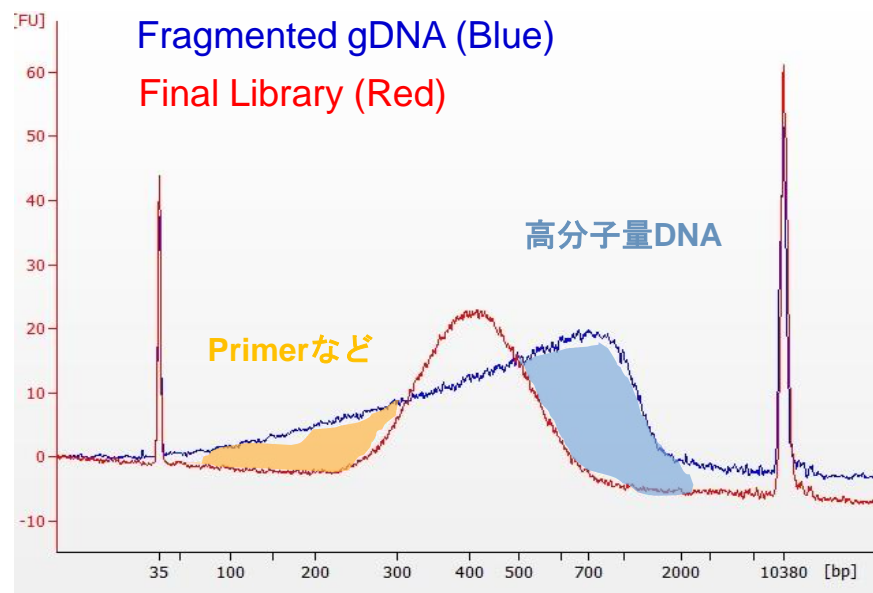


Step 4 : ライブラリーの精製
(0.7時間)



Nextera DNA Flex / ライブラリー精製のポイント

- ✓ SPBの濃度と回収物に注意
高分子量および低分子量のDNAを
順番に除去しています。



ビーズ添加①

上清回収

ビーズ添加②

上清廃棄

DNA溶出

上清回収

ビーズを磁力で固定

ビーズを磁力で固定

ビーズを磁力で固定

高分子量のDNAがビーズに吸着
目的のDNAが含まれる上清を回収

目的のサイズのDNAがビーズに吸着
Primerなどが含まれる上清を廃棄

目的のサイズのDNAを
溶出し、回収する

Step 1 : DNAの断片化①

- ① BLT (Bead Linked Transposome)とTB1 (Tagmentation Buffer)の準備
BLT(冷蔵)を室温に戻し、**ボルテックスで完全に混和する**
TB1(冷凍)を室温で融解、ボルテックスで混和・スピンドウン

- ② Tagmentation Master Mixの作成 (1 サンプル当たり)

BLT (Bead Linked Transposome) 11 μ l

TB1 (Tagmentation Buffer) 11 μ l

Total 22 μ l、ボルテックスで完全に懸濁する

- ③ DNA試料とTagmentation Master MixをPCRプレートへ分注

DNA試料 (1~500 ng) 30 μ l

Tagmentation Master Mix 20 μ l

Total 50 μ l、**ピペットで10回、穏やかに懸濁**



- ④ PCRプレートにプレートシール(PCR用)を貼る

- ⑤ PCR装置でDNAを断片化する

プログラム名 : NF-TAG

Lid 温度 : 100°C 、 Volume : 50 μ l

55°C, 15分

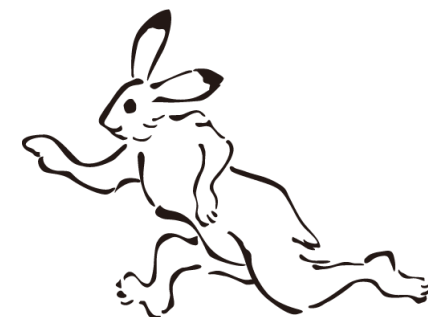
10°C, hold



Step 1-⑥の準備

Step 1 : DNAの断片化②

- ⑥ TSB (Tagment Stop Buffer)とTWB (Tagment Wash Buffer) の準備
TSB(室温)に沈殿物がある場合は、37°C・10分で溶解、ボルテックスで混和
TWB(室温)は、そのまま室温で静置。
- ⑦ TSBの添加
- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| ③の反応液 | 50 μ l |
| TSB (Tagment Stop Buffer) | 10 μ l |
| Total | 60 μ l、ピペットで10回、穏やかに懸濁 |
- ⑧ PCRプレートにプレートシール(PCR用)を貼る
- ⑨ 断片化反応の停止
プログラム名 : NF-STOP
Lid 温度 : 100°C、Volume : 60 μ l
37°C, 15分
10°C, hold



Step 2 : 断片化DNAの精製

① PCRプレートをもグネットスタンド上で3分間静置後、上清を廃棄

② PCRプレートをもグネットスタンドから外す

③ TWBで洗浄する（泡立ちやすいので慎重に）

断片化反応後のtube/plate	沈殿磁気ビーズ
-------------------	---------

TWB (Tagment Wash Buffer)	100 μ l
---------------------------	-------------

Total	100 μ l、ピペットで10回、穏やかに懸濁
-------	-----------------------------

合計2回
洗浄する

④ PCRプレートをもグネットスタンド上で3分間静置後、上清を廃棄

⑤ PCRプレートをもグネットスタンドから外す

⑥ TWBで洗浄する（泡立ちやすいので慎重に）

断片化反応後のtube/plate	沈殿磁気ビーズ
-------------------	---------

TWB (Tagment Wash Buffer)	100 μ l
---------------------------	-------------

Total	100 μ l、ピペットで10回、穏やかに懸濁
-------	-----------------------------

⑦ PCRプレートをもグネットスタンド上で3分間以上静置



Step 3-①の準備

Step 3 : 断片化DNAの増幅①

- ① EPM (Enhanced PCR Mix)とindex adapterの準備
EPM(冷凍)を氷上で融解し、転倒混和・スピンドウン。氷上に静置。
index adapter(冷凍)を室温で融解、ボルテックスで混和・スピンドウン
- ② PCR Master Mixの作成（1サンプル当たり）

EPM (Enhanced PCR Mix)	22 μ l
Nuclease-free water	22 μ l
<hr/>	
Total	44 μ l、ボルテックス後・スピンドウン
- ③ PCRプレートをマグネットスタンド上で3分間以上静置後、上清を廃棄
- ④ P20のピペットで余分なTWBを取り除く
- ⑤ PCRプレートをマグネットスタンドから外す
- ⑥ PCR Master Mixの添加

洗浄後のtube/plate	沈殿磁気ビーズ
PCR Master Mix	40 μ l
<hr/>	
Total	40 μ l、ピペットで10回、穏やかに懸濁



ビーズの乾燥を防ぐため、
先にStep 3-②の準備を実施、
Step 3-④～⑥は迅速に作業する

Step 3 : 断片化DNAの増幅②

⑦ index adapterの添加

⑥のtube/plate	沈殿磁気ビーズ + 40 μ l
i5 adapter	5 μ l
i7 adapter	5 μ l
Total	50 μ l

40 μ lに設定したピペットで10回、穏やかに懸濁

少数(7試料以下)測定の際に使用するindexの組み合わせについては、[Index Adapters Pooling Guide \(part # 1000000041074\)](#)をご確認ください

⑧ PCRプレートにプレートシール(PCR用)を貼る

⑨ 断片化DNAの増幅

プログラム名 : NF-PCR

Lid 温度 : 100°C、Volume : 50 μ l

68°C, 3分

98°C, 3分

98°C, 45秒

62°C, 30秒

68°C, 2分

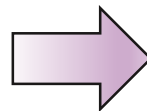
68°C, 1分

10°C, hold



注意事項

PCRサイクル数は
添加したDNA量で
異なります



Step 4-①の準備

または

[Safe Stopping Point] : 4°Cで3日間保存可能

DNA使用量(ng)	PCR cycle
1 - 9	12
10 - 24	8
25 - 49	6
50 - 99	5
100 - 500	5
血液、唾液	5



Step 4 : ライブラリーの精製①

- ① SPB(Purification Beads)、RSB (Resuspension Buffer)、80% エタノールの準備
SPB(冷蔵)を室温で30分放置、**ボルテックスで完全に懸濁する**
RSB (冷凍)を室温で融解、ボルテックスで混和・スピンドウン
80% エタノール（1サンプル当たり600ul使用）を作成する

- ② PCRプレートスピンドウン後、マグネットスタンド上で5分間静置

- ③ マグネットスタンド上のPCRプレートから**45 µlの上清をMIDIプレート[a]へ回収**



- ④ SPB Master Mixの作成（1サンプル当たり）

SPB(Purification Beads)	45 µl
Nuclease-free water	40 µl
Total	85 µl、ボルテックスで完全に懸濁する

- ⑤ SPB Master Mixの添加

MIDIプレート[a]	PCR上清	45 µl
SPB Master Mix		85 µl
Total		130 µl、ピペットで10回、穏やかに懸濁

Step 4 : ライブラリーの精製②

⑥ MIDIプレート[a]を実験台上で5分間静置

⑦ MIDIプレート[a]をマグネットスタンド上で5分間静置

⑧ よく懸濁したSPB原液を、MIDIプレート[b]へ15 µlずつ分注する



⑨ マグネットスタンド上のMIDIプレート[a]から、上清をMIDIプレート[b]へ分注

MIDIプレート[b]	PB 15 µl
-------------	----------

MIDIプレート[a]の上清	125 µl
----------------	--------

Total	140 µl、ピペットで10回、穏やかに懸濁
-------	------------------------

⑩ MIDIプレート[b]を実験台上で5分間静置

⑪ MIDIプレート[b]をマグネットスタンド上で5分間静置後、上清を廃棄

⑫ MIDIプレートをマグネットスタンドに置いたまま、エタノール洗浄

MIDIプレート[b]	沈殿磁気ビーズ
-------------	---------

80% エタノール	200 µl
-----------	--------

Total	200 µl、攪拌しない
-------	--------------



合計3回
洗浄する

⑬ MIDIプレート[b]をマグネットスタンド上で30秒間静置後、上清を廃棄

Step 4 : ライブラリーの精製③

⑭ P20のピペットで余分なエタノールを取り除く

⑮ MIDIプレート[b]をマグネットスタンド上で風乾する



実験環境にもよりますが、5分程度を目安に、
ビーズ表面にヒビが入り始めた時点まで。
過度な風乾は溶出効率を低下させます。



⑯ MIDIプレート[b]をマグネットスタンドから外す

⑰ RSBの添加

MIDIプレート[b]	沈殿磁気ビーズ
RSB (Resuspension Buffer)	32 μ l
Total	32 μ l、ピペットで10回、完全に懸濁

⑱ MIDIプレート[b]を実験台上で2分間静置

⑲ MIDIプレート[b]をマグネットスタンド上で5分間静置

⑳ マグネットスタンド上のMIDIプレート[b]から、上清30 μ lをPCRプレートへ回収、プレートシール(保存用)を貼る

[Safe Stopping Point] : -20°Cで30日間保存可能



illumina

Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー

1. Nextera DNA Flexライブラリー調製キットの紹介
2. DNA試料の準備
 - 注意点、必要量、品質確認
3. ライブラリー調製
 - 関連製品および準備品
 - Nextera DNA Flex調製方法
4. ライブラリー評価、シーケンス条件
 - ライブラリーの定量と定性
 - ローディングDNA濃度、リード長
5. まとめ
 - ライブラリー調製のポイント
 - トラブルシュート

ライブラリーの評価

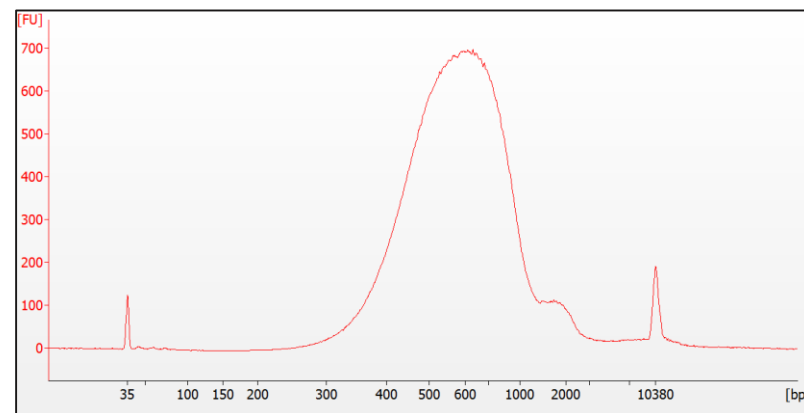
- ライブラリーの定量と定性

<定量方法>

- ・ 蛍光法(QUBITなど)による定量法
期待される収量は、経験的に 10 ng/μl程度となることが多い
- ・ DNA試料(100-500 ng)の場合、等量ずつ新しいtubeに分取(ノーマライズ不要)
- ・ DNA試料(100 ng以下)の場合、サンプル個別に定量し、それぞれ4 nMへ希釈。
等量ずつ新しいtubeに分取
(血液・唾液等の場合は、試料の状態によって収量が変わる場合がある)

<定性方法>

- ・ 電気泳動によるサイズ評価
Agilent 2100 Bioanalyzer (DNA1000)等
精製ライブラリーから 1 μl使用
- ・ 150 – 1500 bpのレンジ
- ・ **600 bp**付近にピーク



Bioanalyzerによる、理想的なライブラリー泳動図

シーケンス条件

- ライブラリーの変性
装置ごとに推奨される手順にて、アルカリ変性・希釈を実施
(必要に応じて、PhiX controlを適量Spike-in)

- 推奨ローディングDNA濃度

Sequencer Platform	至適クラスター密度 (clusters/mm ²)	ローディング濃度 (pM)
HiSeq X		200 - 300
HiSeq 3000/4000		200 - 300
HiSeq 2000/2500 HO V3	750 - 850K	12
HiSeq 2500 RR V2	850 - 1000K	8.5
NextSeq, MiniSeq	70 - 220K	1.2 – 1.3
MiSeq	1200 - 1400K	12
iSeq		250

- リード長
ライブラリーインサートサイズ(300-350 bp)に対応した
リード長を選択可能(2x151 bp 等)

Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー

1. Nextera DNA Flexライブラリー調製キットの紹介
2. DNA試料の準備
 - 注意点、必要量、品質確認
3. ライブラリー調製
 - 関連製品および準備品
 - Nextera DNA Flex調製方法
4. ライブラリー評価、シーケンス条件
 - ライブラリーの定量と定性
 - ローディングDNA濃度、リード長
5. まとめ
 - ライブラリー調製のポイント
 - トラブルシュート

Nextera DNA Flexライブラリー調製のポイント

- ✓ DNA試料の抽出液は、Nuclease-free Water、または、10 mM Tris-HCl(pH8.5)を推奨。
- ✓ DNAの定量および品質確認は、指定された測定法にて実施すること。
- ✓ PCRプレート/プレートシールはサーマルサイクラーに適合したものを使用する。
- ✓ BLTおよびSPBは、ビーズが常にバッファー中に存在する状態で、正立させて冷蔵庫(2-8°C)に保管し、使用前によく懸濁する。
- ✓ TSBおよびTWBは、室温(10-30°C)に保管する。
- ✓ EPMは冷凍庫(-20°C)に保管し、使用前に氷上で解凍する。
- ✓ 80%エタノールは用事調整。
- ✓ 測定ごと、試料ごとのコンタミに注意。
- ✓ Safe Stopping Point以外では、反応は停止できない。
直ちに次の反応へ進むこと。

トラブルシューティング

- ライブラリー収量が極端に少ない場合
 - ・ DNA試料の劣化または不足、BLTの劣化または不足
 - ・ ビーズ精製時のトラブル（洗浄、風乾、回収の工程）
 - ・ 試薬の添加ミス、反応時間の過不足
- ライブラリーサイズが異なる場合
 - ・ DNA試料の使用量と品質を確認
 - ・ 反応温度・時間の確認
 - ・ ビーズ精製工程の確認
- プールライブラリーのデータ量がサンプル間で異なる場合
 - ・ DNA試料の劣化または不足、BLTの不足
 - ・ BLT、SPBの懸濁不足

