

# Illumina Stranded mRNA Prep Ligation

## Reference Guide



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づきいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

商標はすべて、Illumina, Inc. または各所有者の所有物です。商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。

# 目次

<b>第1章 概要</b> .....	<b>1</b>
はじめに.....	1
RNA インプット量に関する推奨事項.....	1
追加リソース.....	2
<b>第2章 プロトコール</b> .....	<b>3</b>
はじめに.....	3
ヒントおよびテクニック.....	4
ライブラリー調製のフロー図.....	5
mRNA の精製と断片化.....	6
第1鎖 cDNA の合成.....	9
第2鎖 cDNA の合成.....	10
3' 末端のアデニル化.....	12
アンカーのライゲーション.....	12
断片の精製.....	14
ライブラリーの増幅.....	15
ライブラリーの精製.....	16
ライブラリーのチェック.....	17
ライブラリーの開始濃度への希釈.....	18
T-オーバーハングのトリミング (オプション).....	19
<b>付録 A サポート情報</b> .....	<b>20</b>
はじめに.....	20
略語.....	20
キットの内容と保管条件.....	20
消耗品および機器.....	23
<b>テクニカルサポート</b> .....	<b>25</b>

# 第1章 概要

はじめに .....	1
RNA インプット量に関する推奨事項 .....	1
追加リソース .....	2

## はじめに

Illumina® Stranded mRNA Prep, Ligation キットは、トータル RNA 中のメッセンジャー RNA (mRNA) を最大 384 のデュアルインデックスライブラリーに変換します。

polyA テールを持つ mRNA 分子をオリゴ (dT) 磁気ビーズにより精製しキャプチャーします。精製された mRNA は断片化され、逆転写酵素とランダムプライマーを用いて第 1 鎖相補的 DNA (cDNA) にコピーされます。第 2 鎖 cDNA 合成ステップで、dUTP が dTTP に代わり、鎖特異性を獲得します。終盤のステップで、断片末端にアデニン (A) 塩基とチミン (T) 塩基が付加され、アダプターが付加されます。最終生成物は精製され、選択的に増幅されて、イルミナのシステムでシーケンスが行えるようになります。

本キットには次のような特徴があります。

- ▶ ポリアデニル化されたコーディング RNA やさまざまな形態のノンコーディング RNA のキャプチャー
- ▶ mRNA を選択的にシーケンスするための polyA キャプチャー
- ▶ ユニークデュアル (UD) インデックスと IDT for Illumina RNA UD Indexes

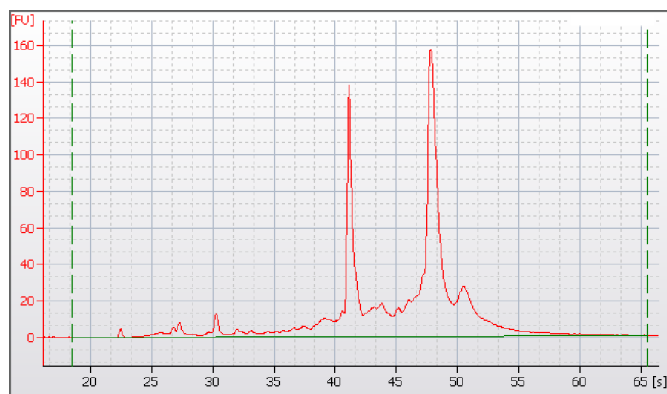
## RNA インプット量に関する推奨事項

本製品のプロトコールは、25 ~ 1000 ng の高品質ヒトトータル RNA 向けに最適化されています。これよりも少ないインプット量では、ライゲーションに影響が生じ、収量が減少する可能性があります。その他の種や品質レベルの場合のインプット量を特定するには、さらなる最適化が必要です。

RNA 抽出法には DNase 処理も含めてください。DNase 処理により、サンプル純度と定量の精度を確かなものにします。本プロトコールを開始する前に、標準的な手法を用いてトータル RNA を定量し、断片解析法により質を調べます。

下の図は、Universal Human Reference (UHR) トータル RNA をインプットした場合のトレースの見本です。トレースには、2100 Bioanalyzer System と RNA 6000 Pico Kit を使用しました。

図 1 UHR をインプットした場合のトレースの例



## 追加リソース

以下のリソースには、Illumina Stranded mRNA キットを使用してライブラリーを調製するための手順とガイドラインが記載されています。詳細については、Illumina Stranded mRNA のサポートページをご覧ください。

- ▶ サンプル情報の記録、ライブラリーのシーケンス、データの解析に対応している製品と要件
- ▶ 本キットの使用に関する Q&A
- ▶ 関連する製品およびトピックの各種コース
- ▶ 本キットの最新版マニュアル

リソース	説明
<a href="#">プロトコールのカスタマイズ</a>	ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、および分析法に合った十分な手順の生成ツールおよび詳細レベルを調整するためのオプションについて説明します。
『Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Checklist』 (文書番号：1000000124519)	経験豊富なユーザー向けの手順チェックリストが用意されています。
『Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Consumables & Equipment』 (文書番号：1000000124520)	ユーザー側で用意する消耗品および機器についての対話型のチェックリストが用意されています。
『Index Adapters Pooling Guide』 (文書番号：1000000041074)	バランスの取れたインデックスコンビネーションを使用して、イルミナのシステムでシーケンスするためのデュアルインデックスライブラリーを調製するためのガイドラインです。
『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号：1000000002694)	イルミナ製シーケンス製品に用いられているイルミナ製オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド配列が用意されています。

## 第2章 プロトコール

はじめに .....	3
ヒントおよびテクニック .....	4
ライブラリー調製のフロー図 .....	5
mRNA の精製と断片化 .....	6
第1鎖 cDNA の合成 .....	9
第2鎖 cDNA の合成 .....	10
3' 末端のアデニル化 .....	12
アンカーのライゲーション .....	12
断片の精製 .....	14
ライブラリーの増幅 .....	15
ライブラリーの精製 .....	16
ライブラリーのチェック .....	17
ライブラリーの開始濃度への希釈 .....	18
T-オーバーハングのトリミング (オプション) .....	19

### はじめに

本章では、Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation のプロトコールの各ステップについて説明します。

- ▶ サンプルから解析に至るまでの完全なシーケンスワークフローを見直し、製品と実験パラメーターの互換性を確認してください。
- ▶ キットの中身を確認し、ライブラリー調製用試薬、インデックスアンカー、インデックスアダプターなど、必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。全項目のリストは、20 ページの「[サポート情報](#)」を参照してください。

### プーリングの準備

ライブラリーをプーリングする場合は、ライブラリー調製を開始する前にサンプルの情報を記録してください。お手持ちのシーケンスシステムおよびライブラリーと互換性のある記録ツールを使用してください。互換性については、Illumina Stranded mRNA のサポートページか、ご使用になるシステムのサポートページをご覧ください。

本プロトコールでは、IDT for Illumina RNA UD Indexes を使用して、最初にアンカーを追加し、次に UD インデックスを追加する 2 つの別のステップでライブラリーにインデックスを付けます。UD インデックスプライマーにより、インデックス 1 (i7) の配列とインデックス 2 (i5) の配列が、断片の各末端に付加されます。インデックス配列の長さはいずれも 10 bp です。

- ▶ プレックス数の少ない、カラーバランスの取れたプールを作成する方法については、『[Index Adapters Pooling Guide](#)』（文書番号：1000000041074）を参照してください。
- ▶ インデックスアダプターの配列とその記録方法については、『[Illumina Adapter Sequences](#)』（文書番号：11000000002694）を参照してください。

### ビーズの取り扱い

本プロトコールでは、RNA Purification Beads と Agencourt AMPure XP を使用します。これらのビーズには、それぞれ特有の技術が応用されているため、他のもので代用することはできません。

ビーズを取り扱う際は、以下の方法で行ってください。

- ▶ ビーズは室温で使用してください。
- ▶ 2°C未満で保管されていたビーズは**使用しないでください**。

- ▶ ビーズは、毎回の使用前と、プロトコールの全体にわたって頻繁にボルテックスし、懸濁してください。懸濁後のビーズは、均等に分布しており、色が均一になっています。
- ▶ 液体をビーズペレットに直接分注し、ウェル側面のビーズにも液体がかかるようにしてください。
- ▶ プレートを磁気スタンドに載せている間は、プレートを激しく攪拌したり、ビーズペレットを動かしたりしないでください。
- ▶ ビーズがピペットチップに吸引された場合は、磁気スタンド上のプレートに分注して戻し、液体が透明になるまで（約2分間）待ちます。
- ▶ ビーズがウェルの側面に付着した場合は、280 × g で3秒間遠心分離し、その後、分注して懸濁します。

## ヒントおよびテクニック

### プロトコールを途中で中断しない

- ▶ 指定のパラメーターを用いて、記載順にプロトコールを実行してください。
- ▶ RNA が二本鎖 cDNA に変換されるまでは、操作を長時間中断しないでください。
- ▶ プロトコールにセーフティストップポイントが指定されていない限り、直ちに次の手順に進んでください。

### クロスコンタミネーションの防止

- ▶ サンプルを添加または移す場合は、**サンプルごとにチップを交換**してください。
- ▶ アダプターまたはプライマーを添加する場合は、**ウェルごとにチップを交換**してください。
- ▶ 使用しないインデックスアダプタープレートは作業台から取り除いてください。

### 試薬および RNA の取り扱い

- ▶ インプットする RNA を複数回凍結／融解しないでください。
  - ▶ RNA は、RNase フリー水または TE バッファーに入れた状態で、-85°C～-65°C で最長1年間保存可能です。
  - ▶ このサンプルを使用する場合は、チューブにアリコートし、単回使用してください。
- ▶ 融解した試薬は必要時まで氷上に置いておいてください。試薬はすべて、使用后、保管場所に正しく戻してください。
- ▶ プレートは、未使用時にはシールして蓋をし、コンタミネーションを最小限に抑えてください。

### プレートのシール

- ▶ プロトコール全体にわたって、Microseal「B」粘着シールを使用してください。このシールは-40°C～110°C で効果を発揮します。
- ▶ このシールでプレートを覆い、ゴム製ローラーまたはゴム製ウェッジで密閉してください。
- ▶ プレートから取り外したシールは、使用后毎回廃棄してください。

### プレート間の移動

- ▶ 溶液をプレートから別のプレートに移す場合は、プレートの各ウェルから特定の分量を取り、別のプレートの対応するウェルに移してください。

### 混合と遠心分離

- ▶ 本プロトコールでは、攪拌による混合か、ピペッティングによる混合のいずれかを選択することができます。それぞれの混合方法に適した磁気スタンドを使用してください。
  - ▶ ピペッティングによる混合を選択した場合は、磁気スタンド -96 を使用してください。

- ▶ 攪拌による混合を選択した場合は、DynaMag-96 Side Magnet を使用してください。
- ▶ 各ステップにおいて、280 × g で 10 秒間遠心分離を行うことで、ウェルの底に溜まっている液体やビーズを均一にしてサンプルロスを防ぎます。

## ライブラリー調製のフロー図

下の図に、Illumina Stranded mRNA のプロトコルの概要を示します。ステップとステップの間にセーフティストップポイントがあります。





## mRNA の精製と断片化

このステップでは、オリゴ (dT) 磁気ビーズを用いて、polyA-tail を持つメッセンジャー RNA (mRNAs) をキャプチャーします。キャプチャーされた RNA は断片化され、プライミングにより cDNA 合成を促します。

### 消耗品

- ▶ BBB (Bead Binding Buffer)
- ▶ BWB (Bead Washing Buffer)
- ▶ ELB (Elution Buffer)
- ▶ EPH3 (Elute, Prime, Fragment High Mix)
- ▶ RPBX (RNA Purification Beads)
- ▶ ヌクレアーゼフリー超純水
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き) (2)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
  - ▶ FSA (First Strand Synthesis Act D Mix)

### 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
BBB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
BWB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
ELB	2°C ~ 8°C	ボルテックスおよび転倒混和します。
EPH3	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。
FSA	- 25°C ~ - 15°C	氷上で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。
RPBX	2°C ~ 8°C	30 分間静置し、室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。

- 2 以下の mRNA\_CAP プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
  - ▶ 反応量を 50  $\mu$ L に設定します。
  - ▶ 65°C で 5 分間
  - ▶ 4°C で 30 秒間
  - ▶ 23°C で 5 分間
  - ▶ 23°C で保持します。
- 3 以下の mRNA\_ELT プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
  - ▶ 反応量を 25  $\mu$ L に設定します。
  - ▶ 80°C で 2 分間
  - ▶ 25°C で保持します。
- 4 以下の DEN94\_8 プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°Cに設定します。
- ▶ 反応量を 19  $\mu$ L に設定します。
- ▶ 94°Cで 8 分間
- ▶ 4°Cで保持します。

## 手順

### mRNA のキャプチャー

- 1 新しいPCR プレートの各ウェル内で、25 ~ 1000 ng のトータル RNA をヌクレアーゼフリー超純水で希釈し、25  $\mu$ L になるようにします。
- 2 RPBX をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに RPBX を 25  $\mu$ L ずつ添加します。
- 4 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ピペッティングを 10 回行い、その後に密閉します。
- 5 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に置き、mRNA\_CAP プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 15 分程で、各ウェルの含有量は 50  $\mu$ L です。

### mRNA の溶出

- 1 密閉した PCR プレートを 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 3 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 4 磁気スタンドから外します。
- 5 各ウェルに BWB を 100  $\mu$ L ずつ添加します。
- 6 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ピペッティングを 10 回行います。
- 7 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 8 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 20  $\mu$ L ピペットで、残存 BWB をすべて除去します。
- 10 磁気スタンドから外します。
- 11 各ウェルに ELB を 25  $\mu$ L ずつ添加します。
- 12 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 13 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 14 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
- 15 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、mRNA\_ELT プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 6 分程で、各ウェルの含有量は 25  $\mu$ L です。

## mRNA の精製

- 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、Fragmentation Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
  - ▶ ヌクレアーゼフリー超純水 (10.5  $\mu$ L)
  - ▶ EPH3 (10.5  $\mu$ L)正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 密閉した PCR プレート を 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
- 各ウェルに BBB を 25  $\mu$ L ずつ添加します。
- 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ピペティングを 10 回行います。
- 室温で 5 分間インキュベートします。
- 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 上清を 50  $\mu$ L 取り除き、廃棄します。
- 磁気スタンドから外します。
- 各ウェルに BWB を 100  $\mu$ L ずつ添加します。
- 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ピペティングを 10 回行います。
- 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 20  $\mu$ L ピペットで、残存 BWB をすべて除去します。
- 磁気スタンドから外します。
- Fragmentation Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
- 各ウェルに Fragmentation Master Mix を 19  $\mu$ L ずつ添加します。
- 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後に密閉します。
- 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後に密閉します。
- 室温で 2 分間インキュベートします。
- 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。

## mRNA の断片化と変性

- 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、DEN94\_8 プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 10 分程で、各ウェルの含有量は 19  $\mu$ L です。
- 密閉した PCR プレート を 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
- 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 各ウェルから、上清を 17  $\mu$ L ずつ、新しい PCR プレートに移します。
- 新しいほうの PCR プレートは氷上に置いておきます。

## 第 1 鎖 cDNA の合成

このステップでは、ヘキサマーで刺激した RNA 断片を逆転写し、第 1 鎖相補的 DNA (cDNA) を生成します。First Strand Synthesis Act D Mix はアクチノマイシン D を含有しています。アクチノマイシン D は、擬似的な DNA 依存的合成を防ぎ、RNA 依存的合成を可能にして鎖特異性を高めます。

### 消耗品

- ▶ FSA (First Strand Synthesis Act D Mix)
- ▶ RVT (Reverse Transcriptase)
- ▶ 1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
  - ▶ Agencourt AMPure XP
  - ▶ RSB (Resuspension Buffer)
  - ▶ SMM (Second Strand Marking Master Mix)



#### 警告

この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については、[support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) に掲載の SDS を参照してください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	2°C ~ 8°C	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RVT	- 25°C ~ - 15°C	必要時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心分離します。
SMM	- 25°C ~ - 15°C	氷上で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。

- 2 以下の FSS プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
  - ▶ 反応量を 25  $\mu$ L に設定します。
  - ▶ 25°C で 10 分間
  - ▶ 42°C で 15 分間
  - ▶ 70°C で 15 分間
  - ▶ 4°C で保持します。

## 手順

- 1 氷上の 1.7 mL チューブ内で以下の分量を正確に混合し、First Strand Synthesis Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプル数を乗じてください。
  - ▶ FSA (9  $\mu$ L)
  - ▶ RVT (1  $\mu$ L)正確にピペティングできるように、上記の分量には試薬が多めに含まれています。
- 2 First Strand Synthesis Master Mix をしっかりピペティングして混合します。
- 3 密閉した PCR プレート を 280  $\times$  g で 10 秒間遠心分離します。
- 4 各ウェルに First Strand Synthesis Master Mix を 8  $\mu$ L ずつ添加します。
- 5 ピペティングを 10 回行い、その後に密閉します。
- 6 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、FSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 43 分程で、各ウェルの含有量は 25  $\mu$ L です。

## 第 2 鎖 cDNA の合成

このプロセスでは、RNA テンプレートを除去し、代替鎖を合成して、末端が平滑化された二本鎖 cDNA 断片を生成します。デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) の代わりにデオキシウリジン三リン酸 (dUTP) を組み込んで第 2 鎖を増幅時に急冷し、鎖特異性を獲得します。

### 消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ SMM (Second Strand Marking Master Mix)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

### 試薬について

- ▶ 80% EtOH は用時調製し、1 日経過後に廃棄してください。本プロトコールには、用時調製 80% EtOH が必要となる精製ステップが 3 つあります。

## 事前準備

- 1 無水 EtOH から 80% EtOH を調製します。
- 2 以下の SSS プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、40°C に設定します。
  - ▶ 反応量を 50  $\mu$ L に設定します。
  - ▶ 16°C で 1 時間
  - ▶ 4°C で最長 16 時間保持します。

## 手順

### cDNA の生成

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 各ウェルに SMM を 25 μL ずつ添加します。
- 3 ピペッティングを 10 回行い、その後に密閉します。
- 4 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、SSS プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 1 時間程で、各ウェルの含有量は 50 μL です。

### cDNA の精製

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに AMPure XP を 90 μL ずつ添加します。
- 4 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングします。
- 5 室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
- 7 上清を 130 μL 除去し、廃棄します。
- 8 ビーズを以下のとおり洗浄します。
  - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL ずつ添加します。
  - b 30 秒間待ちます。
  - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 **2 回目**の洗浄を行います。
- 10 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 11 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズを乾燥しすぎないように注意してください。
- 12 磁気スタンドから外します。
- 13 各ウェルに RSB を 19.5 μL ずつ添加します。
- 14 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 15 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 16 室温で 2 分間インキュベートします。
- 17 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 18 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 19 各ウェルから、上清を 17.5 μL ずつ、新しい PCR プレートに移します。

少量のビーズのキャリーオーバーがあっても性能には影響ありません。

## セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、 $-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$ で保存してください（最長7日間）。

## 3' 末端のアデニル化

このステップでは、平滑断片の3'末端にアデニン（A）ヌクレオチドを付加し、アダプターライゲーション時に3'末端同士が結合しないようにします。アダプターの3'末端上の、対応するチミン（T）ヌクレオチドが相補的なオーバーハングとなり、アダプターが断片に結合します。

## 消耗品

- ▶ ATL4 (A-Tailing Mix)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
  - ▶ アンカープレート (RNA Index Anchor)
  - ▶ STL (Stop Ligation Buffer)

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
アンカープレート	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。
ATL4	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	室温で融解します。軽くはじいて混合し、短時間遠心分離します。
STL	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	室温で融解します。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離します。

- 2 以下の ATAIL プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、 $100^{\circ}\text{C}$ に設定します。
  - ▶ 反応量を  $30\ \mu\text{L}$  に設定します。
  - ▶  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間
  - ▶  $70^{\circ}\text{C}$  で 5 分間
  - ▶  $4^{\circ}\text{C}$  で保持します。

## 手順

- 1 セーフティストップポイントでの中断後にプロトコールを再開する場合は、密閉状態の PCR プレートを  $280 \times g$  で 10 秒間遠心分離します。
- 2 各ウェルに ATL4 を  $12.5\ \mu\text{L}$  ずつ添加します。
- 3  $200\ \mu\text{L}$  ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後に密閉します。
- 4 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、ATAIL プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 38 分程で、各ウェルの含有量は  $30\ \mu\text{L}$  です。

## アンカーのライゲーション

このステップでは、インデックスアンカーを二本鎖 cDNA 断片の末端に結合し、デュアルインデックス化に備えます。その後の PCR 増幅ステップで、インデックスアダプター配列を付加します。

## 消耗品

- ▶ アンカープレート (RNA Index Anchor) (緑色プレート)
- ▶ LIGX (Ligation Mix)
- ▶ STL (Stop Ligation Buffer)
- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム
- ▶ 後の手順のために用意しておくもの：
  - ▶ Agencourt AMPure XP

## 試薬について

- ▶ LIGX は、 $-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$ で保存しても液体のままです。融解は不要です。
- ▶ アンカープレートの各ウェルは単回使用で、RNA Index Anchorを含有します。アンカープレートの各ウェルの含有量は同じで、順不同で使用できます。
- ▶ アンカープレートは緑色で、後のステップで使用する無色のインデックスアダプタープレートと区別できるようになっています。プレートのラベルを確認し、プレートが間違っていないか確認してください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	$2^{\circ}\text{C}$ ～ $8^{\circ}\text{C}$	30分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
LIGX	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	必要時まで保管します。軽くはじいて混合し、短時間遠心分離します。
RSB	$-25^{\circ}\text{C}$ ～ $-15^{\circ}\text{C}$	室温で融解します。ボルテックスおよび転倒混和します。

- 2 以下の LIG プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、 $100^{\circ}\text{C}$ に設定します
  - ▶ 反応量を  $38\ \mu\text{L}$  に設定します。
  - ▶  $30^{\circ}\text{C}$ で 10 分間
  - ▶  $4^{\circ}\text{C}$ で保持します。

## 手順

### アンカーの付加

- 1 密閉した PCR プレート を  $280 \times g$  で 10 秒間遠心分離します。
- 2 以下の分量を、**以下の記載順に**、各ウェルに添加します。RNA Index Anchor をアンカープレートから PCR プレートに移します。

添加順序	試薬	サンプルインプット量が $100\ \text{ng}$ ( $\mu\text{L}$ ) 以下の場合	サンプルインプット量が $100\ \text{ng}$ ( $\mu\text{L}$ ) 超の場合
1	RSB	2.5	0
2	RNA Index Anchor	2.5	5
3	LIGX	2.5	2.5

- 3  $200\ \mu\text{L}$  ピペットでピペッティングを 10 回行って混合し、その後に密閉します。
- 4 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に乗せ、LIG プログラムを実行します。プログラムの所要時間は計 13 分程で、各ウェルの含有量は  $38\ \mu\text{L}$  です。



## ライゲーションの停止

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 各ウェルに STL を 5 μL ずつ添加します。
- 3 ピペッティングを 15 回行って混合します。各ウェルの含有量は 43 μL です。

## 断片の精製

このステップでは、磁気ビーズを用いて、アダプター結合後の断片を精製します。

### 消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% エタノール (EtOH)
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカート付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

### 手順

- 1 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 2 各ウェルに AMPure XP を 34 μL ずつ添加します。
- 3 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングします。
- 4 室温で 5 分間インキュベートします。
- 5 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
- 6 上清を 67 μL 除去し、廃棄します。
- 7 ビーズを以下のとおり洗浄します。
  - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL ずつ添加します。
  - b 30 秒間待ちます。
  - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 8 **2 回目**のビーズ洗浄を行います。
- 9 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 10 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズを乾燥しすぎないように注意してください。
- 11 磁気スタンドから外します。
- 12 各ウェルに RSB を 22 μL ずつ添加します。
- 13 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 14 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペッティングし、その後に密閉します。
- 15 室温で 2 分間インキュベートします。

- 16 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 17 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 18 新しい PCR プレートの、対応する各ウェルに、上清 20 μL を移します。増幅 PCR サイクル数は、サンプルのインプット量によって異なります。複数のサンプルを調製する場合は、[ライブラリーの増幅手順書](#)に記載されている PCR サイクル数に従って、別々のプレートに移してください。

### セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、− 25°C ~ − 15°C で保存してください（最長 7 日間）。

## ライブラリーの増幅

このステップでは、アンカーを結合させた DNA 断片を PCR により選択的に増幅し、インデックスを付加し、配列を刺激してクラスター形成を促します。こうして、デュアルインデックス化ライブラリー、すなわち両末端にアダプターが付加された DNA 断片が出来上がります。

インデックスアダプターの選択については、3 ページの「[プーリングの準備](#)」を参照してください。

### 消耗品

- ▶ EPM (Enhanced PCR Mix)
- ▶ インデックスアダプタープレート (UDPOXXX)

### 試薬について

- ▶ インデックスアダプタープレートの各ウェルは単回使用で、UDPOXXX (10 μL 超) を含有します。UDPOXXX は、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターとインデックス 2 (i5) アダプターです。
- ▶ 行および列のラベルはインデックスアダプタープレートの底面に印刷されています。プレートを持ち上げてラベルを確認してください。

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
EPM	− 25°C ~ − 15°C	室温で融解します。転倒混和し、短時間遠心分離します。
インデックスアダプタープレート	− 25°C ~ − 15°C	室温で融解します。ボルテックスして混合し、1000 × g で 1 分間遠心分離します。

- 2 下の表に記載されている適切な PCR サイクル数を用いて、以下の PCR プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
  - ▶ プレヒートリッドオプションを選択し、100°C に設定します。
  - ▶ 反応量を 50 μL に設定します。
  - ▶ 98°C で 30 秒間
  - ▶ サイクル数 X :
    - ▶ 98°C で 10 秒間
    - ▶ 60°C で 30 秒間
    - ▶ 72°C で 30 秒間
  - ▶ 72°C で 5 分間
  - ▶ 4°C で最長 16 時間保持します。

プログラムを調整して、異なるインプット量で最適化します。

複数のサンプルを 1 枚のプレートで増幅する場合は、それぞれのサンプルのインプット量が同じになるようにしてください。

インプット量 (ng)	PCR サイクル数 (X)
25	15
100	13
1000	10

プログラムの所要時間は、15 サイクルで計 44 分程、13 サイクルで計 39 分程、10 サイクルで計 33 分程です。

## 手順

- 1 セーフティストップポイントでの中断後にプロトコルを再開する場合は、密閉状態の PCR プレートを 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 ウェルごとに新しいピペットチップを用いて、今回使用するインデックスアダプタープレートのウェルを覆っているホイルに穴を開けます。
- 3 以下の分量を、**以下の記載順に**、PCR プレートの各ウェルに添加します。UDPOXXX をインデックスアダプタープレートから PCR プレートに移します。
  - ▶ UDPOXXX (10 µL)
  - ▶ EPM (20 µL)
- 4 ピペティングを 10 回行って混合し、その後に密閉します。
- 5 事前にプログラムしたサーマルサイクラーの上に載せ、PCR プログラムを実行します。各ウェルの含有量は 50 µL です。

### セーフティストップポイント

中断する場合は、プレートにシールした後、- 25°C ~ - 15°C で保存してください（最長 7 日間）。

## ライブラリーの精製

このステップでは、磁気ビーズを用いてデュアルインデックスライブラリーを精製します。

### 消耗品

- ▶ RSB (Resuspension Buffer)
- ▶ Agencourt AMPure XP
- ▶ 用時調製 80% EtOH
- ▶ 96 ウェル PCR プレート (セミスカーフ付き)
- ▶ Microseal 「B」 粘着フィルム

## 事前準備

- 1 次の消耗品を準備してください。

試薬	保管条件	説明
AMPure XP	2°C ~ 8°C	30 分間静置し室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。
RSB	- 25°C ~ - 15°C	室温で融解します。ボルテックスおよび転倒混和します。

## 手順

- 1 密閉した PCR プレート を 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 2 AMPure XP をボルテックスして懸濁します。
- 3 各ウェルに AMPure XP を 50 μL ずつ添加します。
- 4 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉して 2000 rpm で 1 分間攪拌し、その後、280 × g で 10 秒間遠心分離します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングします。
- 5 室温で 5 分間インキュベートします。
- 6 磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
- 7 上清を 90 μL 除去し、廃棄します。
- 8 ビーズを以下のとおり洗浄します。
  - a 磁気スタンドに載せたまま、各ウェルに用時調製 80% EtOH を 175 μL ずつ添加します。
  - b 30 秒間待ちます。
  - c 上清をすべて除去し、廃棄します。
- 9 **2 回目**のビーズ洗浄を行います。
- 10 20 μL ピペットで、残存 EtOH をすべて除去します。
- 11 磁気スタンド上で 2 分間風乾します。ビーズを乾燥しすぎないように注意してください。
- 12 磁気スタンドから外します。
- 13 各ウェルに RSB を 17 μL ずつ添加します。
- 14 次のいずれかの方法で混合します。
  - ▶ 密閉し、2200 rpm で 1 分間攪拌します。
  - ▶ ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後に密閉します。
- 15 攪拌してもビーズが完全に懸濁されなかった場合は、ビーズが懸濁されるまでゆっくりとピペティングし、その後に密閉します。
- 16 室温で 2 分間インキュベートします。
- 17 280 × g で 10 秒間遠心分離します。
- 18 磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
- 19 各ウェルから、上清を 15 μL ずつ、新しい PCR プレートの、対応するウェルに移します。

### セーフティストップポイント

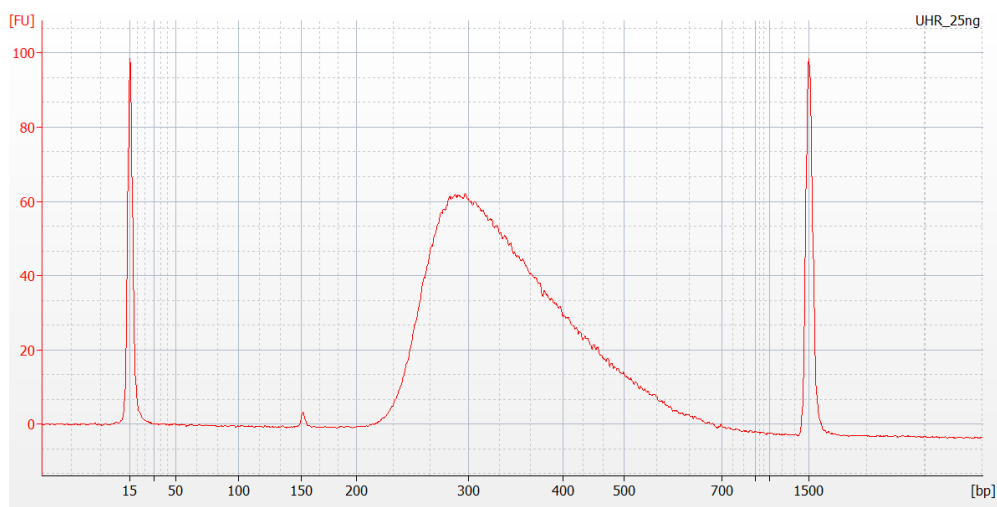
中断する場合は、プレートにシールした後、- 25°C ~ - 15°C で保存してください（最長 30 日間）。

## ライブラリーのチェック

このステップでは、最終ライブラリーの濃度と質をチェックします。

- Agilent 2100 Bioanalyzer と DNA 1000 Kit を用いて、ライブラリー 1  $\mu\text{L}$  の解析を行います。下の図は、インプット量 25 ng の Universal Human Reference (UHR) RNA から作製した最終ライブラリーのトレース見本です。

図 2 Bioanalyzer によるトレースの見本



- 【オプション】** さらなる定量のために、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて、ライブラリー 2  $\mu\text{L}$  の解析を行います。インタクトな RNA サンプルの場合、平均断片長は約 300 ~ 400 bp、想定されるインサートサイズは約 160 bp です。

## ライブラリーの開始濃度への希釈

このステップでは、ライブラリーを、NovaSeq 6000 システム、NextSeq 550 システム、あるいは NextSeq 500 システムでの開始濃度に希釈します。開始濃度への希釈後に、ライブラリーは、変性できる状態かつ最終ローディング濃度に希釈できる状態となります。シーケンスにはペアエンドランを推奨します。インデックスリード当たりのサイクル数は 10 です。リード当たりのサイクル数はシーケンスシステムによって異なります。

- 該当する手法を用いて、ライブラリーまたはライブラリープールのモル濃度を求めます。
  - Bioanalyzer のみで定量したライブラリーの場合は、そのライブラリーのモル濃度を使用します。
  - Bioanalyzer と Qubit で定量したライブラリーの場合は、以下の式よりモル濃度を算出します。Bioanalyzer より求めた平均サイズと、Qubit より求めた濃度を使用します。

$$\frac{\text{ng}/\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{average library size}} \times 10^6 = \text{Molarity (nM)}$$

- モル濃度を用いて、ライブラリーを使用システムの開始濃度に希釈するのに必要な RSB とライブラリーの量を算出します。

シーケンスシステム	開始濃度 (nM)	最終ローディング濃度 (pM)
NextSeq 550/NextSeq 500	1	1.1 ~ 1.4
NovaSeq 6000	0.5	100

- RSB を用いて、それぞれのライブラリーを、使用システムの開始濃度に希釈します。希釈後の 10  $\mu\text{L}$  のライブラリーをチューブ内で結合し、ライブラリーをプールします。
- 使用システムの変性希釈手順に従って、ライブラリーを最終ローディング濃度に希釈します。

## T-オーバーハングのトリミング (オプション)

このステップでは、初回サイクルのヌクレオチドを FASTQ 生成モードでトリミングし、T-オーバーハングを除去します。

Illumina Stranded mRNA により、cDNA インサートに T ヌクレオチドが追加され、cDNA インサートをアダプターに結合できるようになります。T ヌクレオチドを追加すると、各インサートリードの初回サイクルにおける多様性が低下し、初回シーケンスサイクルでのベースコールがランダムになります。解析の品質を高めるため、初回サイクルのヌクレオチドをトリミングすることを推奨します。

1 BaseSpace Sequence Hub 上で FASTQ Toolkit アプリケーションを使用してトリミングを行うには、以下の操作を行ってください。

- a ベーストリミングの設定画面を拡大します。
- b 「Trim reads at the 5'-end by n positions」欄に「1」と入力します。

2 サンプルシートを使用してトリミングを行うには、サンプルシートファイルに次の設定を追加します。

- ▶ Read1StartFromCycle,2
- ▶ Read2StartFromCycle,2



### 警告

FASTQ 生成モードは、ラン当たり 1 つの設定にのみ対応しています。ご使用になるライブラリーの設定が間違っていないか確認するため、別のサンプルシートを使用して、T-オーバーハングのないライブラリーでデマルチプレックスを行ってください。

# サポート情報

はじめに .....	20
略語 .....	20
キットの内容と保管条件.....	20
消耗品および機器 .....	23

## はじめに

本ガイドに記載されているプロトコールは、お客様がこの付録の内容に目を通し、キットの内容を確認し、必要な消耗品および機器をすべて入手していることを前提としています。

## 略語

略語	定義
A	アデニン
ATL4	A-Tailing Mix
BBB	Bead Binding Buffer
BWB	Bead Washing Buffer
cDNA	相補的 DNA
dsDNA	二本鎖 DNA
dTTP	デオキシチミジン三リン酸
dUTP	デオキシウリジン三リン酸
ELB	Elution Buffer
EPH3	Elute、Prime、Fragment、High Concentration Mix
EPM	Enhanced PCR Mix
EtOH	エタノール
FSA	First Strand Synthesis Act D Mix
LIGX	Ligation Mix
mRNA	メッセンジャー RNA
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
RIN	RNA Integrity Number
RPBX	RNA Purification Beads
RSB	Resuspension Buffer
SMM	Second Strand Master Mix
STL	Stop Ligation Buffer
T	チミン
UD	ユニークデュアル
UHR	Universal Human Reference

## キットの内容と保管条件

ライブラリー調製を開始する前に、本セクションに記載されている試薬がすべて揃っていることを確認してください。本プロトコールには、Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation キット一式と、IDT for Illumina RNA UD 1 セット以上が必要です。4 セットすべて組み合わせると、最大 384 のライブラリーのインデックス化が可能です。

項目	製品名	当社カタログ番号
ライブラリー調製	Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples)	20040532
	Illumina Stranded mRNA Prep (Ligation) (96 Samples)	20040534
インデックス	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 Samples)	20040553
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 Samples)	20040554
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 Samples)	20040555
	IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 Samples)	20040556

上記の調製キットには、16 サンプルサイズまたは 96 サンプルサイズ用の mRNA 選択用試薬、cDNA 合成用試薬、ライブラリー調製用試薬が含まれています。インデックスセットには、混合済みのインデックス 1 (i7) アダプターおよびインデックス 2 (i5) アダプター、ならびにライゲーションに必要なアダプターが含まれています。

これらのイルミナ製品には、Agencourt AMPure XP ビーズは含まれていません。サプライヤーについては、23 ページの「消耗品および機器」をご覧ください。

## Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples) (20040532)

### Illumina PolyA Capture

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	BBB	Bead Binding Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
3	BWB	Bead Washing Buffer	黄色	2°C～8°C	2°C～8°C
1	ELB	Elution Buffer	透明	2°C～8°C	2°C～8°C
1	RPBX	RNA Purification Beads	透明	2°C～8°C	2°C～8°C

### Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	EPH3	Elute, Prime, Fragment, High Concentration Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	FSA	First Strand Synthesis Act D Mix	琥珀色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C

### Illumina RNA Prep, Ligation

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	ATL4	A-Tailing Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	LIGX	Ligation Mix	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C
1	STL	Stop Ligation Buffer	赤色	-25°C～-15°C	-25°C～-15°C



## Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Samples) (20040534)

### Illumina PolyA Capture

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
1	BBB	Bead Binding Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
1	BWB	Bead Washing Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
3	ELB	Elution Buffer	透明	2℃～8℃	2℃～8℃
4	RPBX	RNA Purification Beads	透明	2℃～8℃	2℃～8℃

### Illumina cDNA Synthesis

数量	試薬	説明	キャップ	出荷時	保管条件
4	EPH3	Elute、Prime、Fragment、High Concentration Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	FSA	First Strand Synthesis Act D Mix	琥珀色	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
2	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
1	RVT	Reverse Transcriptase	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	SMM	Second Strand Marking Master Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

### Illumina RNA Prep, Ligation

数量	試薬	説明	キャップの色	出荷時	保管条件
4	ATL4	A-Tailing Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	EPM	Enhanced PCR Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	LIGX	Ligation Mix	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	RSB	Resuspension Buffer	透明	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
4	STL	Stop Ligation Buffer	赤色	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A Ligation (96 indexes, 96 Samples) (20040553)

数量	説明	出荷時	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A (UDP0001-UDP0096)	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B Ligation (96 indexes, 96 Samples) (20040554)

数量	説明	出荷時	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B (UDP0097-UDP0192)	-25℃～-15℃	-25℃～-15℃

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C Ligation (96 indexes, 96 Samples) (2004555)

数量	説明	出荷時	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C (UDP0193-UDP0288)	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C

## IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D Ligation (96 indexes, 96 Samples) (20040556)

数量	説明	出荷時	保管条件
1	IDT for Illumina RNA Index Anchors	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C
1	IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D (UDP0289-UDP0384)	- 25°C ~ - 15°C	- 25°C ~ - 15°C

### 消耗品および機器

本プロトコールは、本ガイドに記載されている消耗品および機器を用いて最適化と検証がなされています。これら以外の消耗品および機器を使用した場合には、同等の性能は保証されません。

### 補助消耗品

消耗品	サプライヤー
1.7 mL マイクロチューブ (RNase フリー)	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µL バリアーピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µL バリアーピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µL バリアーピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
96 ウェル twin.tec 250 µL PCR プレート(セミスカート付き)	以下のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>フィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：E951020303</li> <li>VWR、カタログ番号：47744-106</li> </ul>
Agencourt AMPureXP (60 mL)	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63881
Agencourt RNAClean XP (40 mL)	ベックマン・コールター、カタログ番号：A63987
Agilent DNA 1000 Kit	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：5067-1504
コニカル遠心チューブ (15 mL または 50 mL)	一般的なラボ用品サプライヤー
無水エチルアルコール (500 mL)	シグマ アルドリッチ、カタログ番号：E7023
Microseal [B] Plate Sealing Film	バイオ・ラッド、カタログ番号：MSB-1001
ヌクレアーゼフリー超純水	一般的なラボ用品サプライヤー
RNase/DNase フリーのマルチチャンネル試薬リザーバー (ディスポーザブル)	VWR、カタログ番号：89094-658
RNaseZap <sup>1</sup>	一般的なラボ用品サプライヤー
【オプション】 Universal Human Reference RNA 陽性対照 サンプル	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：740000
【オプション】 Agilent RNA 6000 Pico Kit	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：Q32856
【オプション】 Qubit Assay Tubes	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32856
【オプション】 Qubit dsDNA BR Assay Kit	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32850 または Q32853

<sup>1</sup> 表面汚染除去用

## 補助機器

機器	サプライヤー
20 $\mu$ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 $\mu$ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
2100 Bioanalyzer System	アジレント・テクノロジー、カタログ番号：G2939BA
【攪拌ワークフロー】 BioShake iQ 高速サーモシェーカー	Q Instruments、カタログ番号：1808-0506
【攪拌ワークフロー】 BioShake PCR プレートアダプター	Q Instruments、カタログ番号：1808-1041
以下の磁気製品のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>● 【攪拌ワークフロー】 DynaMag-96 Side Magnet</li> <li>● 【ピペットワークフロー】 Magnetic Stand-96</li> </ul>	該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> <li>● サーマフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：12331D</li> <li>● サーマフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：AM10027</li> </ul>
遠心マイクロプレート	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の 96 ウェルサーマルサイ클ラーのいずれか： <ul style="list-style-type: none"> <li>● Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler</li> <li>● T100 Thermal Cycler</li> </ul>	該当するサプライヤー： <ul style="list-style-type: none"> <li>● バイオ・ラッド、カタログ番号：1851196</li> <li>● バイオ・ラッド、カタログ番号：1861096EDU</li> </ul>
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
【オプション】 Qubit 2.0 Fluorometer	サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号：Q32866

## テクニカルサポート

技術的な支援については、イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。

**Website:** [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Email:** [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

### イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	リージョナル
北米	+1.800.809.4566	
オーストラリア	+1.800.775.688	
オーストリア	+43 800006249	+43 19286540
ベルギー	+32 80077160	+32 34002973
中国	400.066.5835	
デンマーク	+45 80820183	+45 89871156
フィンランド	+358 800918363	+358 974790110
フランス	+33 805102193	+33 170770446
ドイツ	+49 8001014940	+49 8938035677
香港	800.960.230	
アイルランド	+353 1800936608	+353 016950506
イタリア	+39 800985513	+39 236003759
日本	0800.111.5011	
オランダ	+31 8000222493	+31 207132960
ニュージーランド	0800.451.650	
ノルウェー	+47 800 16836	+47 21939693
シンガポール	+1.800.579.2745	
韓国	+82 80 234 5300	
スペイン	+34 911899417	+34 800300143
スウェーデン	+46 850619671	+46 200883979
スイス	+41 565800000	+41 800200442
台湾	806651752	
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
その他の国	+44.1799.534000	

製品安全データシート (SDS) —当社のウェブサイト ([support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html)) から入手できます。

製品マニュアル—[support.illumina.com](http://support.illumina.com) よりダウンロード可能です。



イルミナ株式会社  
東京都港区芝 5-36-7  
三田ベルジュビル 22 階  
サポート専用フリーダイヤル  
0800-111-5011  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。  
© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®