



TruSeq[®] RNA Sample Preparation v2 Guide

研究目的での使用に限定
ILLUMINA PROPRIETARY
カタログ番号 : RS-122-9001DOC
パーツ番号 : 15026495 Rev. F JPN
2014 年3月



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を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指示を熟読せず、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。

本製品は研究目的での使用に限定されます。

© 2011–2013 Illumina, Inc. All Rights Reserved. (不許複製・禁無断転載)

Illumina, IlluminaDx, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDx, NeoPrep, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, VeriSeq, パンプキンオレンジ色および遺伝子エネルギーの流れをベースとしたデザインは、Illumina, Inc.の商標または登録商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。

本製品のご使用前に

本製品ならびにその使用および廃棄は、以下の条件に従うものとします。購入者がこれらの条件に同意しない場合、イルミナは購入者に対して本製品を使用する許可を与えず、購入者は本製品を使用してはならないものとします。

- 定義。「特定用途向けIP」とは、**イルミナが所有または管理する本製品（およびその使用）に関連する知的財産権のうち、特定分野または特定の用途のみに関するものを意味します。特定用途向けIPには、イルミナが所有または管理する知的財産のうち、本製品（およびその使用）の側面または性質があらゆる可能な用途およびあらゆる可能な使用分野において本製品に共通的なものである場合に、それらの側面または性質を対象とした知的財産（以下、「コアIP」という）は一切含まれません。特定用途向けIPおよびコアIPは、イルミナが所有または管理するすべての知的財産のうち、別個で重複のない部分集合です。特定用途向けIPの例を制限なく挙げると、特定の診断法、特定の法医学的手法または特定の核酸バイオマーカー、シーケンス、バイオマーカーもしくはシーケンスの組み合わせに対するイルミナの知的財産権などが挙げられます。「**本消耗品**」とは、イルミナが本ハードウェアと併用することを意図し、本ハードウェアの使用により消費され、イルミナのブランドが付された試薬および消耗品を意味します。「**文書類**」とは、本製品に関するイルミナのユーザマニュアル（イルミナからの出荷日の時点で有効な添付文書、および本製品に添付されるか、本製品が参照するかまたは本製品の容器に封入されたその他の文書を含みます）が、これらに限定されないものとします。本ガイドは、文書に含まれます。「**本ハードウェア**」とは、イルミナのブランドが付された機器、付属品または周辺機器を意味します。「**イルミナ**」とは、場合に応じてIllumina, Inc.またはイルミナの関連会社を意味します。「**本製品**」とは、本ガイドが添付される製品（本ハードウェア、本消耗品または本ソフトウェアなど）を意味します。「**購入者**」とは、イルミナまたはイルミナの認定販売業者から、本製品を正当かつ合法的に取得する個人または団体です。「**本ソフトウェア**」とは、イルミナのブランドが付されたソフトウェア（本ハードウェアを運用するソフトウェア、データを分析するソフトウェアなど）を意味します。すべての本ソフトウェアは、販売されるのではなくライセンス許諾され、本ソフトウェアのエンドユーザライセンス契約に記載された追加条件が適用される可能性があります。「**本仕様書**」とは、本製品がイルミナから出荷される日の時点で有効な、本製品に関するイルミナの仕様書を意味します。
- 研究目的での使用に限定された権利。**本条件に従うことを条件として、またイルミナの役員が別途書面で合意した場合を除き、購入者は、本製品がイルミナから出荷される日の時点で存在するイルミナのコアIPに基づき、本製品を購入者の施設において、購入者内の研究目的（第三者に提供される研究サービスを含む）のために限り、また本製品の文書類に従う場合に限り使用するための非独占的、譲渡不能かつサブライセンス不能な、私的な権利のみを許諾されます。ただし、以下の使用については明確に対象外とします。すなわち、(a)イルミナから特定用途向けIPに対する権利またはライセンスを取得する必要がある使用、(b)使用済みの本消耗品の再利用、(c)本製品の逆アセンブル、リバーエンジニアリング、逆コンパイルまたは逆アセンブル、(d)本製品のコンポーネントの分離、抽出もしくは単離またはその他、本製品の不正な分析、(e)本製品の動作方法へのアクセスまたは当該動作方法の解明、(f)イルミナ製ではない試薬または消耗品とイルミナの本ハードウェアとの併用（本仕様書または文書類に別途の記載がある場合は適用されません）、または(g)本ソフトウェアもしくは第三者のソフトウェアの第三者への譲渡またはサブライセンスです。すべての本ソフトウェアは、単独で提供されたものか、または本製品にインストールもしくは組み込まれたものであるかにかかわらず、販売されるのではなく、購入者にライセンス許諾されます。本条に明示的に記載されたものを除き、イルミナのいずれの知的財産権に基づく権利またはライセンスも、明示的、黙示的または禁反言によって許諾されないものとします。

購入者は、本製品の自らの用途に必要なすべての知的財産権（第三者から取得する権利または特定用途向けIPに対する権利を含みますが、これらに限定されません）を自身が有しているか否かの判断について、全責任を負うものとします。イルミナは、購入者の特定の用途が、第三者の知的財産権または特定用途向けIPを侵害しないことについて一切保証しません。

- 3 **規制。**本製品は、研究用、商用、診断用またはその他にかかわらず特定の用途に関して、米国食品医薬品局または国内外のその他の規制機関から、承認、許可またはライセンスを受けたものではありません。本製品には、研究目的以外の使用禁止と明記されています。購入者は、本製品の自らの用途に必要な規制当局による承認を確実に取得しなければならないものとします。
- 4 **不正使用。**購入者は、(a)本消耗品それぞれの使用は1回のみとすること、および (b) イルミナの消耗品または試薬をイルミナの本ハードウェアとの併用に限り使用することに同意します。本製品に関する文書類または本仕様書に別途の記載がある場合は、(a)および(b)の制限は適用されないものとします。購入者は、以下のいずれの行為にも携わらず、また第三者に対して当該行為に携わることを許可しないことに同意します。すなわち、(i)本製品の逆アセンブル、リバースエンジニアリング、逆コンパイルまたは逆アセンブル、(ii)本製品のコンポーネントの分離、抽出もしくは単離、または本製品もしくはそのコンポーネントに対して本製品の文書類で明示的に認められていない分析を行う行為、(iii)本製品の動作方法へのアクセスまたは当該動作方法を解明しようとする行為、または(iv)本ソフトウェアもしくは第三者のソフトウェアの第三者への譲渡またはサブライセンスの付与です。購入者はさらに、本製品の内容およびその動作方法がイルミナの所有物であり、本製品はイルミナの営業秘密を含み、またはこれを組み込んでいることに同意します。本条件に記載された条件および制限は、購入者による本製品の販売条件として考慮され、したがって購入者による本製品の販売および使用を規制します。
- 5 **責任の制限。**法律で認められる範囲においていかなる場合も、イルミナまたはその関連会社は、購入者または第三者に対して、代替の製品もしくはサービスの調達費用、逸失利益、データの喪失または取引上の損失について、また、本製品の販売、本製品の使用、本文書に基づくイルミナの履行もしくは本条件のいずれかなどに起因して、またはこれら関連して生じたあらゆる種類の間接損害、特別損害、付随的損害、懲罰的損害または派生的損害について、これらがどのようにして生じたかにかかわらず、またはいかなる責任の法理（契約、過失を含む不法行為、厳格責任その他を問わない）のもとでも一切責任を負わないものとします。
- 6 **本条件（本製品（その使用を含む）および本文書に基づくイルミナの履行を含みますが、これらに限定されません）に起因して、またはこれに関連してイルミナが購入者または第三者に対して負う累積責任の総額は、いかなる場合も、契約、過失を含む不法行為、厳格責任またはその他のいずれに基づくかを問わず、本製品に関してイルミナに支払われた金額を上回らないものとします。**
- 7 **イルミナが行う保証に対する制限。**法律で認められる範囲において、また本文書で行われる明示的な製品保証に従うことを条件として、イルミナは本製品について、明示、黙示または制定法上のいかなる保証（商品性、特定目的の適合性もしくは侵害のないことについての黙示の保証、または履行、取引、使用もしくは売買の過程から生じる保証を含みますが、これらに限定されません）も行わない（また、これらすべてを明示的に排除します）。上記の一般性を制限することなく、イルミナは、購入者の用途に対する本製品の有用性について、いかなる種類の主張、表明または保証も行わないものとします。
- 8 **製品保証。**すべての保証は、購入者に固有のものであり、購入者の関連会社を含む第三者に譲渡してはなりません。すべての保証は、施設に固有のものであり、本製品が購入者の他の施設に移された場合であっても移転しないものとします（イルミナが当該移動を実施した場合を除きます）。
 - a **本消耗品に対する保証。**イルミナは、(i)イルミナからの出荷日から3カ月、および(ii)イルミナがその本消耗品に印刷した品質保持期限の満了日のうち、いずれか遅く到来する時点まで（ただし、いかなる場合も出荷日から12カ月以内）、本消耗品（特注の本消耗品を除く）が、本仕様書に合致することを保証します。特注の本消耗品（購入者が作成した仕様または設計に基づき製造された本消耗品、または購入者もしくはその代理人がイルミナに提出した仕様または設計に基づき製造された本消耗品など）については、イルミナは、イルミナの標準的な製造プロセスおよび品質管理プロセスに基づき特注の本消耗品が製造され、テストされることのみを保証します。イルミナは、特注の本消耗品が購入者の意図するとおり、または購入者の用途に応じて動作することについて一切保証しません。
 - b **本ハードウェアに対する保証。**イルミナは、アップグレードコンポーネントを除く本ハードウェアが、イルミナからの出荷日から12カ月間、本仕様書に適合することを保証します。ただし、本ハードウェアにイルミナが設置する設備が含まれる場合はこの限りではなく、その場合、保証期間の開始日は、設置日または本ハードウェアの納入日から30日後のうち、いずれか早い方とします（以下、「ハードウェア基本保証」といいます）。「アップグレードコンポーネント」とは、事前に購入者が入手している本ハードウェアに対してイルミナが提供するコンポーネント、変更または拡張を意味します。イルミナは、アップグレードコンポーネントがその設置日から90日間、本仕様書に適合することを保証します。アップグレードコンポーネントは、本ハードウェアの保証を拡大するものではないが、ただし、当該アップグレードが、イルミナの施設においてイルミナによって実施された場合はこの限りではありません（その場合、アップグレードされて購入者に出荷された本ハードウェアには、ハードウェア基本保証が付く）。
 - c **保証除外項目。**上記の保証は、(i)乱用、誤用、怠慢、過失、事故、不適切な保管または文書類もしくは本仕様書に反した使用、(ii)不適切な取り扱い、設置、保管または修理（イルミナの担当者による場合を除く）、(iii)無断変更、(iv)不可抗力事由、または(v)イルミナが提供したのではない第三者の製品との併用（当該第三者の製品が本製品の併用に適していることが、本製品の文書類または本仕様書に明記されている場合を除く）により不適合が生じている限りは、適用されないものとします。

- d **保証申請手続き。**本保証に基づく修理または交換の対象となるためには、購入者は、(i)イルミナのサポート部門に速やかに連絡して不適合を報告し、(ii)不適合の確認または診断においてイルミナに協力し、また、(iii)イルミナの指示に従い、本製品および前払いされた送料をイルミナに返却するか、またはイルミナと購入者との間で合意がある場合は、不適合の確認および修理を行うため、イルミナ公認の修理担当者に本製品へのアクセスを許可しなければならないものとします。
- e **保証に基づく唯一の救済。**イルミナは、本保証の対象であることが確認される不適合の本製品を、自らの裁量で修理または交換します。修理または交換された本消耗品には、30日間の保証が付きます。本ハードウェアは、修理するか、または同等の機能を持つ中古もしくは新品の本ハードウェアまたはコンポーネント（本ハードウェアのコンポーネントのみが不適合である場合）と交換することができます。本ハードウェアが全面的に交換された場合、交換品の保証期間は、出荷日から90日間または元の本ハードウェアの保証の残存期間のいずれか短い方の期間とします。コンポーネントのみが修理または交換された場合、当該コンポーネントについての保証期間は、出荷日から90日間または元の本ハードウェアの保証の残存期間のいずれか長い方の期間とします。上記は、本文書に基づき与えられる保証のもとで、購入者の唯一の救済およびイルミナの唯一の義務を定めたものです。
- f **第三者の製品および保証。**イルミナは、本文書に基づき購入者に供給される第三者の製品については、いかなる保証義務も負いません。第三者の製品とは、第三者の名称が記載されるかまたは第三者のブランドが付された製品をいいます。第三者の製品について保証がある場合は、元の製造業者がこれを提供します。書面による要請に応じて、イルミナは、当該保証を購入者に転嫁するよう努めます。

9 補償

- a **イルミナによる侵害補償。**本条件（イルミナの補償義務の除外項目（以下の第9条(b)）、補償義務の条件（以下の第9条(d)）を含むが、これらに限定されない）に従うことを条件に、イルミナは、(i)本条件ならびに本製品の文書類および本仕様書に基づき研究目的で使用された本製品が、第三者の有効かつ強制可能な知的財産権を侵害すると主張する第三者による請求または訴訟が生じた場合、これについて購入者を防御し、補償し、かつ免責し、また、(ii)当該侵害請求に関連して購入者が支払いを命じられたすべての和解費用ならびにすべての最終判決および費用（合理的な弁護士費用を含む）を支払うものとします。本製品もしくはその一部が侵害請求の対象となった場合、またはイルミナの意見においてその対象となりうる場合、イルミナは、自らの裁量で以下を行う権利を有するものとします。すなわち、(A)購入者のために本製品の使用を継続する権利を取得し、(B)本製品を修正するか、もしくは実質的に同等な侵害のない代替品と交換し、または、(C)本製品の返却を要求し、本製品に関して購入者に付与した権利、ライセンスその他の許可を終了させ、返却された本製品の減価償却後価額（購入者の公式記録に記載）を当該返却時に購入者に返金します。ただし、完全に消費された本消耗品または期限切れの本消耗品については、返金を行わないものとします。本条は、第三者の知的財産権の侵害に対してイルミナが負う全責任について定めたものです。
- b **イルミナの補償義務の除外項目。**イルミナは、侵害が以下の事由によって生じている限り、イルミナに対する侵害請求について購入者を防御し、補償し、または免責する義務を一切負わないものとします。すなわち、(i)研究目的での使用の範囲外の方法または目的による本製品の使用、(ii)本製品の仕様書、文書類もしくは本文書に基づき購入者に明示的に付与された権利に基づく方法以外での本製品の使用、または購入者による本条件の違反、(iii)イルミナから供給されたもの以外の製品、材料またはサービスと本製品との併用、(iv)イルミナから供給されたもの以外の分析試料その他のプロセスを用いるための本製品の使用、または、(v)購入者またはその代理人から提供された本製品に関する仕様書または指示のイルミナによる遵守である（(i)から(v)までをそれぞれ「補償除外項目」といいます）。
- c **購入者による補償。**購入者による本条件のいずれかの違反、(ii)購入者による研究目的の範囲外での本製品の使用、(iii)本製品の仕様書もしくは文書類に反する本製品の使用、または(iv)補償除外項目のいずれかによって生じるか、これらに関連するかまたはこれらに起因するあらゆる種類の請求、責任、損害賠償、罰金、訴訟原因および損失（人身傷害または死亡、および第三者の知的財産権の侵害を含みますが、これらに限定されません）について、イルミナ、その関連会社、本製品の開発に貢献した関連会社以外の共同制作者および開発パートナーならびにそれぞれの役員、取締役、代表者および従業員を防御し、補償し、かつ免責するものとします。
- d **補償義務の条件。**両当事者の補償義務は、補償を求める当事者が以下を行うことを条件とします。すなわち、(i)当該請求または訴訟について他方当事者に書面で速やかに通知すること、(ii)他方当事者に対して、当該請求もしくは訴訟の防御または解決についての独占的支配権および権限を与えること、(iii)他方当事者の書面による事前同意を得ずに、いかなる知的財産権の侵害も許可しないこと、(iv)他方当事者の書面による事前同意を得ずに、当該請求もしくは訴訟の解決または和解を行わないこと、および(v)請求または訴訟の防御において、他方当事者に合理的な支援を提供すること（ただし他方当事者は、被補償当事者が当該支援を提供する際に生じた合理的な自己負担費用を、被補償当事者に弁済する）です。
- e **第三者の製品および補償。**イルミナは、購入者に供給される第三者の製品については、いかなる補償義務も負わないものとします。第三者の製品とは、第三者の名称が記載されるかまたは第三者のブランドが付された製品をいいます。第三者の製品について購入者に補償を求める権利がある場合は、元の製造業者またはライセンサーによる補償に基づくものとします。書面による要請に応じて、イルミナは当該補償を購入者に転嫁するよう努めます。

改訂履歴

パーツ番号	改訂	日付	変更内容
15026495	F	2014年3月	<ul style="list-style-type: none">• CDPのインキュベーション1の手順において42°Cでのインキュベーション時間を訂正
15026495	E	2014年1月	<ul style="list-style-type: none">• total RNAのインプット量を0.1~1 µgに変更• 単離したmRNAのインプット量を10~100 ngに変更• IMPのインキュベーション1をIMPのインキュベーションに変更• キット内容でボックス1の輸送温度を訂正• RNA Purification Beadsのパーツ番号を訂正• 機器リストにバイオアナライザおよびDNA 1000 Kitを追加• 新しいセクション「追加リソース」を追加• BaseSpace®でのサンプル、ライブラリー、プーリング、およびランの管理に関する言及を追加• ベストプラクティスのセクションを、イルミナのウェブサイトコンテンツへの参照に差し替え• <i>Adapter Options</i>および<i>Pooling Guidelines</i>のセクションを『<i>TruSeq Sample Preparation Pooling Guide</i>』（パーツ番号：15042173）への参照に差し替え• 略語一覧、キット内容、消耗品および機器、およびインデックスアダプターの配列を含む新しい補足情報を作成• 付録代替の断片化プロトコールにおいて、必要断片化時間が0分のサンプルに関する指示を明記

パーツ番号	改訂	日付	変更内容
15026495	D	2012年9月	<ul style="list-style-type: none"> • 予め単離したmRNAからスタートする場合、RFPのインキュベーションからプロトコールを始めることを明記 • <i>Usage Guidelines</i>で試薬容量の表を改訂： <ul style="list-style-type: none"> • RNA AdapterチューブおよびRNA Purification Beadsを追加 • コントロール、Bead Washing BufferおよびFirst Strand Master Mixの容量を改訂 • ステップにより容量が異なるためResuspension Bufferを削除 • キット内容でPCRプライマーカクテルのパーツ番号を訂正 • 各ステップ冒頭の消耗品リストを表形式に変更 • mRNAの精製および断片化のステップでResuspension Bufferの融解を行い、第2鎖cDNA合成のステップで使用するまでに十分な時間があるように変更。エンドリペアの事前準備からResuspension Bufferを融解する指示を削除、すでに融解されているため • 一度融解した後にResuspension Bufferを保管する温度を2°C~8°Cへ変更 • 3'末端のアデニル化におけるALPのインキュベーション1のステップに、70°C 5分間のインキュベーション、続いて4°Cホールドを追加 • HSプロトコールにおいてALPのインキュベーション1のステップに対応するため、マイクロヒーティングシステムおよびMIDIプレートインサートを2セット用意するように推奨を追加
15026495	C	2012年5月	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Usage Guidelines</i>に試薬容量の表を追加 • <i>Tracking Tools</i> ドキュメントのダウンロードに関する情報を訂正 • 各インデックスアダプターに対しキットボックスへの参照を追加 • 少数のインデックスの組み合わせについて<i>Pooling Guidelines</i>を追加 • <i>消耗品および機器</i>で1.5 mL RNase/DNaseフリー 低吸着チューブおよびMagnetic stand-96の供給元名を変更 • サンプル調製ワークフローの略図にエンドリペアの手順を含むよう訂正 • LSプロトコール全体にわたり、溶液を混和する前にピペットを特定の容量にセットするよう指示する箇所を削除 • RFPの調製—サンプルへ添加する前にBBBを遠心するステップを追加 • CDPの調製—First Strand Master Mixに対するSuperScript IIの比率を明記 • 付録A—代替の断片化プロトコール： <ul style="list-style-type: none"> • ライブラリーインサート断片化処理時間に脚注bを明記 • 断片化処理時間を短縮した結果を示す図を追加

パーツ番号	改訂	日付	変更内容
15026495	B	2012年2月	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Low Throughput (LT)</i> プロトコールの名称を <i>Low Sample (LS)</i> プロトコールに変更 • <i>High Throughput (HT)</i> プロトコールの名称を <i>High Sample (HS)</i> プロトコールに変更 • <i>TruSeq RNA Sample Prep v2</i> ドキュメントのカタログ番号を削除 • ベストプラクティスのセクションを変更： <ul style="list-style-type: none"> • <i>Handling Master Mix Reagents</i> のセクションを追加 • <i>AMPure XP Handling</i> のセクション名を <i>Handling Magnetic Beads</i> に変更 • <i>Usage Guidelines</i> を明記 • <i>Equipment</i> セクションを追加 • <i>Tracking Tools</i> セクションを変更： <ul style="list-style-type: none"> • サンプルシートのフォーマットに関するガイドラインを削除し、詳細なサンプルシートのガイドラインについてはシーケンス解析ソフトウェアを参照するよう変更 • <i>Illumina Experiment Manager</i> を導入 • <i>Kit Contents</i> セクションを変更： <ul style="list-style-type: none"> • キットのパーツ番号を追加 • <i>Bead Binding Buffer</i>、<i>RNA Purification Beads</i>、および <i>PCR プライマーカクテル</i> のパーツ番号を変更 • プロトコール全体から「ビーズ塊を乱さないように注意し、サンプル毎にチップを交換する」の指示を削除、代わりに各プロトコールの「はじめに」でベストプラクティスを参照するように注記を追加

パーツ番号	改訂	日付	変更内容
15026495	B	2012年2月 (承前)	<ul style="list-style-type: none"> • 手順からサーマルサイクラーのリッド予熱およびプログラム詳細を削除、サーマルサイクラーのプログラムに関する指示は各手順の事前準備セクションと重複しており、リッド予熱に関しても記述されるようになったため • 文書全体で「マルチプレックス化」を「インデックス化」にし、デュアルインデックスおよびシングルインデックスの両方を指すように変更 • mRNAの精製および断片化 (LSプロトコール) — 予め単離した10~400 ngのmRNAからプロトコールをスタートする場合について改訂 • RBPの洗浄—ビーズ塊を乱さないようにするため、プレートをマグネットにセットする前に粘着シールをはがす • Second Strand Master Mixは48サンプルあたり1チューブ必要であると表示 • CDPの調製—SuperScript IIとFirst Strand Master Mixの比率を訂正 • CDPのクリーンアップをCDPの精製に変更 • アダプターのライゲーション (LSプロトコール) —CAPプレートからPCRプレートへ上清を移す最終ステップを追加 • DNAフラグメントの濃縮 : <ul style="list-style-type: none"> • 事前準備のセクションでPMMおよびPPCについて「各1チューブ」の表記を削除、48反応あたり1チューブが必要なため • PCRの調製 (LSプロトコール) —溶液の混和ステップでピペットを50 µLへセットするように変更 • ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリングの手順/セクションがオプションであるという表記をすべて削除、ノーマライゼーションは必須であるため。プーリングは引き続きオプションです。 • PDPの調製—2~24ライブラリーを含むようサンプルプーリングの情報を更新 • 付録A—代替の断片化プロトコール : <ul style="list-style-type: none"> • サーマルサイクラーのElution 2 - Frag - Primeプログラムの温度を更新 • 平均ライブラリー長の情報を追加
15026495	A	2011年8月	初版リリース

目次

改訂履歴	v
目次	ix
表目次	xi
第1章 概要	1
はじめに	2
プロトコールの特徴	3
RNAインプットの推奨	4
インラインコントロールDNA	6
追加のリソース	8
第2章 Low Sample (LS) プロトコール	11
はじめに	12
サンプル調製ワークフロー	13
アダプターセットアップの準備	14
mRNAの精製および断片化	15
第1鎖cDNAの合成	20
第2鎖cDNAの合成	22
末端修復	25
3'末端のアデニル化	28
アダプターのライゲーション	30
DNAフラグメントの濃縮	34
ライブラリーの検証	37
ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング	39
第3章 High Sample (HS) プロトコール	41
はじめに	42
サンプル調製ワークフロー	43
アダプターセットアップの準備	44
mRNAの精製および断片化	45
第1鎖cDNAの合成	51
第2鎖cDNAの合成	53
エンドリペア	56
3'末端のアデニル化	60
アダプターのライゲーション	62
DNAフラグメントの濃縮	67
ライブラリーの検証	71
ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング	73

付録A 補足情報	75
はじめに	76
略語一覧	77
キットの内容	79
消耗品および機器	84
TruSeq RNA Sample Prep Kit v2インデックスアダプターの配列	87
付録B 代替の断片化プロトコール	91
はじめに	92
RNA断片化処理時間の調節	93
ds cDNA合成後のサンプル断片化	95
索引	97
テクニカルサポート	99

表目次

表1	プロトコールの特徴	3
表2	インラインコントロールの機能	6
表5	ユーザーが用意する消耗品	84
表6	ユーザーが用意する消耗品—LSプロトコール用に追加で必要なもの	85
表7	ユーザーが用意する消耗品—HSプロトコール用に追加で必要なもの	85
表8	ユーザーが用意する機器	86
表9	ユーザーが用意する機器—HSプロトコール用に追加で必要なもの	86
表10	DNAキット用Alternate Assay Set Aインデックスアダプターの配列	87
表11	DNAキット用Alternate Assay Set Bインデックスアダプターの配列	87
表12	TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Set Aインデックスアダプターの配列	88
表13	TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Set Bインデックスアダプターの配列	88
表14	RNA LTおよびChIPキット用Product Line Set Aインデックスアダプターの配列	88
表15	RNA LTおよびChIPキット用Product Line Set Bインデックスアダプターの配列	89
表16	ライブラリーインサート断片化処理時間	93

概要

はじめに	2
プロトコールの特徴	3
RNAインプットの推奨	4
インラインコントロールDNA	6
追加のリソース	8



はじめに

本プロトコールでは、Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2の試薬を使用し、total RNA中のmRNAから、クラスター形成およびDNAシーケンスに適したテンプレート分子のライブラリーを作製する方法について解説します。

ワークフローの第1ステップでは、オリゴ-dTが結合した磁気ビーズを用い、ポリAを持つmRNAを精製します。精製の後、高温条件下で2価陽イオンによりmRNAを短いサイズに断片化します。断片化したRNAフラグメントから、逆転写酵素とランダムプライマーを使用して第1鎖cDNAを合成します。続いてDNA Polymerase IおよびRNase Hを使用し第2鎖cDNAを合成します。cDNAフラグメントはエンドリペアを行った後、「A」を一塩基付加して、アダプターのライゲーションを行います。ライゲーション産物を精製し、PCRによる濃縮を行い最終的なcDNAライブラリーを作製します。

本サンプル調製プロトコールは以下を提供します：

ストリームライン化されたワークフロー

- ▶ 試薬はマスターミックス化されており、試薬容器、ピペッティング回数、およびハンズオンタイムを縮小
- ▶ mRNAサンプルを調製するためのユニバーサルアダプター

ハイスループット

- ▶ 24種類のインデックスアダプター（Set Aキット 12種類、Set Bキット 12種類）により、両キットを併用すると、シーケンス用に96検体分のインデックスmRNAサンプルを同時に調製可能
- ▶ 標準的な96ウェルプレートに最適化された反応溶液量

改善されたトラブルシューティング法

- ▶ QCのためのステップ確認用コントロールが組み込み済み

ユニバーサルインデックスアダプターはすべてのサンプルに結合

- ▶ 他のアダプターおよびプライマーは不要

プロトコールの特徴

本ユーザーガイドでは、Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit v2またはAlternate Kitを使用するサンプル調製プロトコールについて述べます。

- ▶ 第2章 Low Sample (LS)プロトコールでは、Low Sampleプロトコールを使用してTruSeq RNAサンプル調製v2を行う方法について説明します。
- ▶ 第3章 High Sample (HS)プロトコールでは、High Sampleプロトコールを使用してTruSeq RNAサンプル調製v2を行う方法について説明します。

どちらのプロトコールを使用しても同等の結果が期待できますが、相違点は以下の通りです：

表1 プロトコールの特徴

	Low Sample	High Sample
一度に処理するサンプル数	≤ 48 インデックスアダプター使用	> 48 インデックスアダプター使用
使用するプレートの種類	96ウェル0.3 mL PCR 96ウェルMIDI	96ウェルHSP 96ウェルMIDI
インキュベーション用の機器	96ウェルサーマルサイクラー	96ウェルサーマルサイクラー マイクロヒーティングシステム
混合手法	ピペッティング	マイクロプレートシェーカー

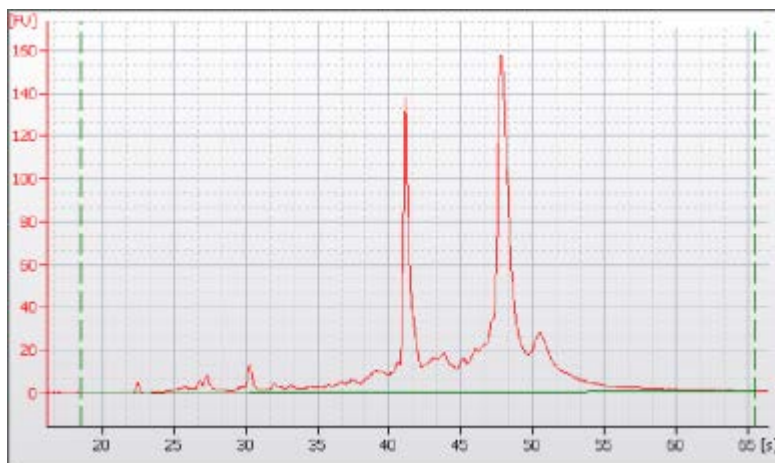
RNAインプットの推奨

TruSeq RNAサンプル調製 v2においては、インプットに関する推奨事項に従うことが重要です。

Total RNAインプット

- ▶ 最適化
 - TruSeq RNAサンプル調製v2のプロトコールは0.1~1 µgのtotal RNAに最適化されています。
 - それよりもRNA量が少ない場合ライゲーションの効率が下がり、収量が低くなる可能性があります。
- ▶ プロトコールのテスト
 - TruSeq RNAサンプル調製v2プロトコールは、0.1~1 µgの高品質なUniversal Human Reference total RNAをインプットとしてテストを行っています。
 - テストとは異なる生物種、組織、または品質のRNAを使用した場合、インプット量に合わせてプロトコールのさらなる最適化が必要になる可能性があります。
- ▶ 本プロトコールでは、dsDNAからライブラリーを作製するステップをトラッキングするためにインラインコントロール希釈溶液の使用を推奨します。
 - 各希釈溶液は0.1~1 µgの高品質なインプットRNA用に最適化されています。
 - それより少ない量のRNAまたはmRNA量が非常に低いRNAを使用する時は、インラインコントロールのさらなる希釈が必要な場合があります。
 - コントロールを加えない場合は、プロトコール中でコントロールの代わりにResuspension Bufferを使用します。
- ▶ スタート材料となるRNAの品質を調べておくことが重要です。断片化の条件は高品質なRNAに合わせて最適化されています。
 - 同じ断片化条件を、完全長RNAよりも短く分解したRNAに使用すると、ライブラリーのサイズが短くなります。ライブラリーが短いと収量の低下またはプロトコールの失敗がおこる可能性があります。
 - 分解したRNAを使用すると、収量が低下したり、RNA分子の3'末端部分にシーケンスリードが偏ったり、あるいはプロトコールが失敗する可能性があります。
 - total RNAを単離した後、アジレント・テクノロジー社の2100 バイオアナライザによる品質確認を行い、ヒト（または哺乳類）サンプルでRNA Integrity Number (RIN)が8以上であることを確認するよう推奨します。
 - RNAにDNAが混入している場合、使用RNA量を実際よりも低く見積もる結果につながります。
 - RNA抽出の際にDNase処理を行うことを推奨します。ただし、DNAのコンタミネーション要因はmRNA精製中に除去されます。
- ▶ 以下の図に、スタート材料としたUniversal Human Reference (UHR) total RNAをバイオアナライザで解析した結果を示します。

図1 バイオアナライザによるスタートRNAの泳動像



他の方法では、ホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色を行ってRNAの品質を評価することもできます。

- 高品質なRNAは、4.5 kb付近に28S rRNA、1.9 kb付近に18S rRNAのバンドがあり、28Sのバンド強度は18Sの約2倍となります。
- 両バンドのサイズは、RNA 6000 ladderに基づいて決定されます。
- mRNAは0.5 kbから12 kbの間にスメアとして現れます。

精製mRNAインプット

すでに精製されているmRNAをスタート材料として使用することもできます。その場合、0.1 μg ~1 μg のトータルRNAより精製したmRNAの全量を使用します。精製mRNAからスタートする場合は、mRNAの精製および断片化ステップのはじめににある、精製mRNAに関する推奨に従ってください。RNAの断片化は、LSプロトコールの場合は18ページ、RFPのインキュベーションから、HSプロトコールの場合は50ページ、RFPのインキュベーションから始めます。

ポジティブコントロール

本プロトコールでは、アジレント・テクノロジー社のHuman UHR total RNA（カタログ番号：740000）をポジティブコントロールサンプルとして使用することを推奨します。

インラインコントロールDNA

End Repair Control、A-Tailing Control、およびLigation Control試薬にはそれぞれEnd Repair Mix、A-Tailing Mix、およびLigation Mixの酵素活性を確認するためのコントロールとして使用するDNA断片が含まれています。各試薬には、ライブラリー調製のステップにおいて特定の酵素反応が成功しているかどうか分かるように設計されたdsDNA断片が含まれています。そのリードアウトはシーケンスにより明らかになります。Sequence Analysis Viewer (SAV) で見る最終的なシーケンスデータにインラインコントロールの配列があれば、そのコントロールに対応するステップは成功したことを示します。コントロールの配列が無い場合、またはその数が大幅に少ない場合、そのステップが不成功だったことを示します。コントロールはトラブルシューティングのために存在し、失敗した原因を特定するのに役立ちますが、ライブラリーからシーケンスデータが生成されなかった場合は情報が得られません。



注記

コントロールの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます。

コントロール分子は、その末端構造によってコントロールの役割を果たします。コントロールは、プロトコル中の対応するステップを行う前に反応溶液へ添加します。コントロールの末端は、対応するステップを通過する前のDNA分子と同じ構造になっています。ステップが成功した場合、コントロール分子は修飾を受け、ライブラリー作製の次の反応へと進み、シーケンスデータが生成されます。ステップが失敗した場合、コントロール分子は次のステップへ進まず、シーケンスデータは生成されません。1 µgのスタート材料を使用すると、クラスタの約0.2%がコントロール由来となりますが、ライブラリーの収量によってその割合は変化します。

表2 インラインコントロールの機能

試薬	反応	コントロール	コントロールDNAの末端構造
End Repair Mix	エンドリペア：3'→5'エキソヌクレアーゼ活性および5'→3'ポリメラーゼ活性により末端を平滑化	End Repair Control 1*	一端が5'オーバーハング、もう一端が3'オーバーハング
End Repair Mix	エンドリペア：後のライゲーションで必要となる5'-リン酸基を付加	End Repair Control 2*	5'-OH基を持つ平滑末端
A-Tailing Mix	A付加：一塩基の3'-Aオーバーハングを付加し、アダプターがライゲーションできる状態にすると同時にセルフライゲーションを防ぐ	A-Tailing Control	5'-リン酸基を持つ平滑末端
Ligation Mix	ライゲーション：3'-Tオーバーハングのアダプターを3'-Aオーバーハングのインサートへ結合する	Ligation Control	一塩基3'「A」オーバーハング

*End Repair Control 1およびEnd Repair Control 2は、End Repair Control試薬に含まれている別々のコントロールです。

コントロール試薬は、様々なインサートサイズのライブラリーに使用できます。各コントロールにはおよそ150 bpから850 bpまで、100 bp刻みのDNAラダーが含まれています。各コントロール分子は独自のDNA配列を持っており、その機能とサイズが分かるようになっています。RTAソフトウェア（v1.9以降）はコントロールの配列を認識し、コントロールのリードをシーケンスリード本体から分離します。RTAは、レーン毎のコントロールリード数をRTA status.html ページのコントロールタブに出力します。SAVIにおけるコントロールのリードアウトについて詳しくは『*Sequence Analysis Viewer User Guide*』（パーツ番号：15020619）を参照してください。

追加のリソース

TruSeq RNA Sample Preparation v2 protocolの手引きおよびサンプルトラッキングに関して、以下のリソースが利用可能です。イルミナのウェブサイト support.illumina.com/sequencing/kits.ilmnでこれらのリソースならびにその他のリソースへアクセスできます。上記のサイトで[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]を選択してください。

リソース	内容
トレーニング	<p>TruSeq RNA Sample Preparation v2の要点を解説します。初心者または経験の浅いユーザーには、サンプル調製を始める前にこれらのビデオを視聴することを推奨します。</p> <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Training]をクリックしてください。</p>
ベストプラクティス	<p>本プロトコルに関連するベストプラクティスを解説します。サンプル調製を始める前にこれらのベストプラクティスを確認してください。以下の項目が含まれます：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 溶液の取り扱い • マスターミックス試薬の取り扱い • 磁気ビーズの取り扱い • クロスコンタミネーションの防止 • 考えられるDNAコンタミネーション要因 • 温度に関して • 機器 <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Best Practices]をクリックしてください。</p>
『TruSeq RNA Sample Preparation v2 Low Sample Experienced User Card and Lab Tracking Form』 (パーツ番号：15026498)	<p>本ユーザーガイドに比べ細部を省略したLSプロトコルの説明書です。初心者または経験の浅いユーザーは、EUCおよびLTFではなく、本ユーザーガイドに従って実験することを推奨します。</p> <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Documentation & Literature]をクリックしてください。</p>
『TruSeq RNA Sample Preparation v2 High Sample Experienced User Card and Lab Tracking Form』 (パーツ番号：15026497)	<p>本ユーザーガイドに比べ細部を省略したHSプロトコルの説明書です。初心者または経験の浅いユーザーは、EUCおよびLTFではなく、本ユーザーガイドに従って実験することを推奨します。</p> <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Documentation & Literature]をクリックしてください。</p>

リソース	内容
Illumina Experiment Manager (IEM)	<p>イルミナのシーケンサーおよび解析ソフトウェア用のサンプルシートを作成および編集し、サンプルプレートのパラメーターを記録することができます。</p> <p>ソフトウェアをダウンロードするには[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Downloads]をクリックしてください。</p> <p>説明書をダウンロードするには[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Documentation & Literature]をクリックしてください。</p>
Analysis Software (AS) [®]	<p>シーケンスデータの解析ツールであり、サンプル、ライブラリー、プール、およびシーケンスランの管理も単一の環境でできます。</p> <p>Analysis Software (AS)についての詳細な情報は support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/basespace.ilmn を参照してください。</p>
『TruSeq Sample Preparation Pooling Guide』（パーツ番号 15042173）	<p>サンプル調製におけるTruSeqプーリングの手引き。ライブラリー調製を始める前にこのガイドを確認してください。</p> <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Documentation & Literature]をクリックしてください。</p>
『Sequencing Library qPCR Quantification Guide』（パーツ番号 11322363）	<p>Illuminaのサンプル調製プロトコールで作製したsequencing by synthesis (SBS) 用ライブラリーを定量するためのqPCR法に関する解説です。</p> <p>[TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Support]で[Documentation & Literature]をクリックしてください。</p>

Low Sample (LS)プロトコール

はじめに	12
サンプル調製ワークフロー	13
アダプターセットアップの準備	14
mRNAの精製および断片化	15
第1鎖cDNAの合成	20
第2鎖cDNAの合成	22
末端修復	25
3'末端のアデニル化	28
アダプターのライゲーション	30
DNAフラグメントの濃縮	34
ライブラリーの検証	37
ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング	39



はじめに

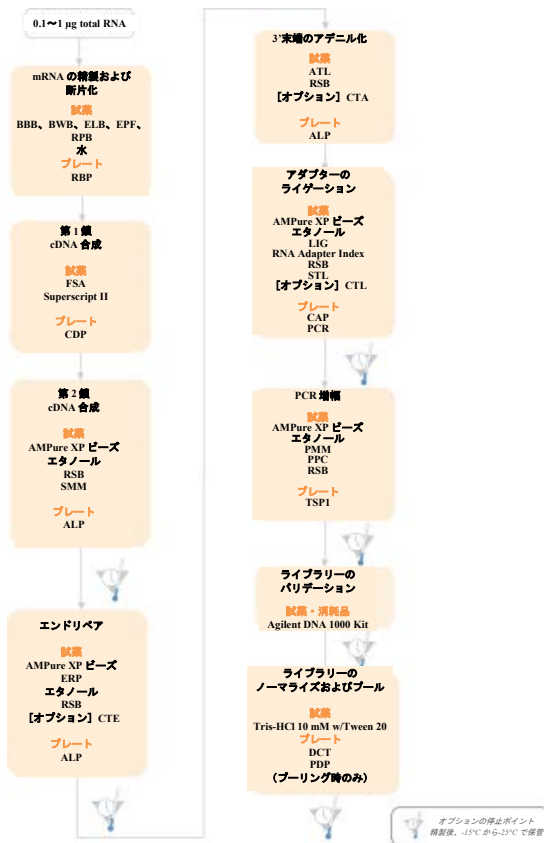
本章ではTruSeq RNAサンプル調製 v2のLSプロトコールについて述べます。一度に処理するサンプル数が48以下の場合、LSプロトコールを推奨します。48を超えるサンプルを一度に処理する場合には、第3章 High Sample (HS)プロトコールを推奨します

- ▶ 記述されている順序通りプロトコールに従い、指定された容量およびインキュベーション条件を使用します。
- ▶ 開始する前に以下を確認してください：
 - ベストプラクティス—8ページ、*追加リソース*で、イルミナのウェブサイトのTruSeq RNAサンプル調製v2ベストプラクティスにアクセスする方法を確認してください。
 - 付録A 補足情報—キットの内容を確かめ、LSプロトコールに必要な機器および消耗品がすべて揃っていることを確認してください。

サンプル調製ワークフロー

24種類のインデックスアダプターを使用してテンプレートを調製するか、TruSeq RNAサンプル調製v2 LSプロトコルのワークフローを以下に示します。

図2 TruSeq RNAサンプル調製v2 LSワークフロー



アダプターセットアップの準備

プーリングを行う場合、ライブラリー調製を始める前にIEMまたはAnalysis Software (AS)を使用し、サンプルに関する情報を記録してください。

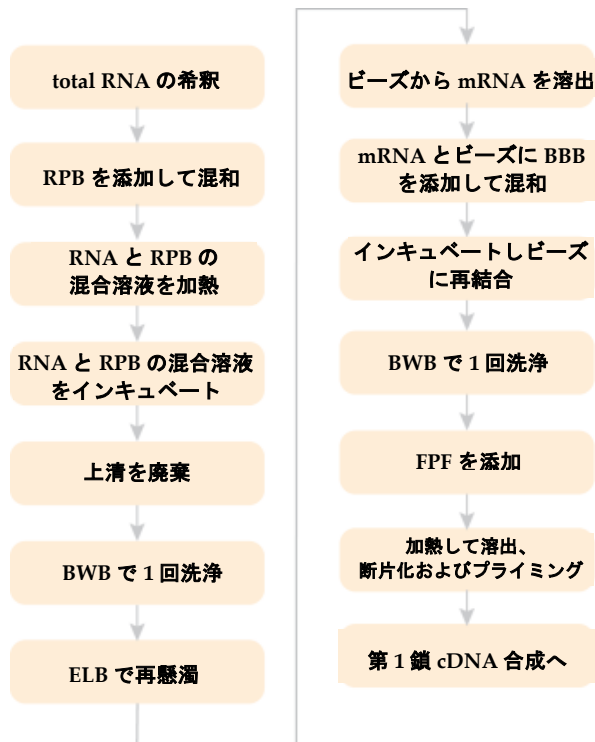
- ▶ 以下のいずれかを行ってください：
 - IEMを使用し、イルミナのシーケンサーおよび解析ソフトウェアで使用するサンプルシートを作製および編集します。イルミナのウェブサイトからIEMソフトウェアおよび説明書をダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。
 - Analysis Software (AS)を使用し、イルミナのシーケンサーおよび解析ソフトウェア用に、サンプル、ライブラリー、プール、およびランの管理を行います。BaseSpaceへのアクセス方法またはイルミナのウェブサイトからBaseSpaceの説明書をダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。
- ▶ 『*TruSeq Sample Preparation Pooling Guide*』（パーツ番号：15042173）で、プランニングステップについて確認してください。イルミナのウェブサイトから同ガイドをダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。

後で1つのプールに混ぜ合わせるサンプルは、横1列のウェルに並べておくことを推奨します。また、縦1列のウェルには同じインデックスを加えるようにします。このように配置しておく、後でインデックスアダプターを加える際およびインデックス化したライブラリーをプールする際にピペット操作が容易になります。

mRNAの精製および断片化

本プロセスでは、オリゴ-dTを結合させた磁気ビーズを使用して精製を2ラウンド行い、ポリA配列を持つmRNAを精製します。2回目のポリA RNA溶出を行う際に、RNAの断片化およびcDNA合成に向けたプライミングを行います。精製ステップを行う間、以下の図を参照してください。

図3 TruSeq RNAサンプル調製v2 精製ワークフロー



再現性を確保するため、上記の手順を厳密に守ることが重要です。



注記

マグネットスタンド上に5分間置き、ビーズを完全にペレット化させます。マグネットスタンド上でビーズがペレット状になっている間に、速やかに上清をビーズから除去します。ペレットを乾燥させないでください。



注記

このプロセスでは、0.1~1 µgのtotal RNAを用い、PCRプレートとプレート用マグネットスタンドの使用を推奨します。または、すでに精製された10~100 ngのmRNAからスタートすることもできます。その場合、Elute、Prime、Fragment Mixへ加える前に、エタノール沈殿またはQIAGEN MinEluteカラムによりmRNAを5 µL以下に濃縮しておく必要があります。

- エタノール沈殿を行った場合、ペレットを18 µLのElute、Prime、Fragment Mixに溶かします。
- QIAGEN MinEluteカラムを使用した場合、mRNAを5 µLの分子生物学用水で溶出し、13 µLのElute、Prime、Fragment Mixを加えます。溶出ボリュームが少ないため、MinEluteカラムを使用した場合は最大で50%のmRNAをロスすることがあります。

いずれの場合も、本プロセスの19ページ、RFPのインキュベーションにおいてmRNAをElute、Prime、Fragment Mix中で加熱し、断片化を行います。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Bead Binding Buffer (BBB)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Bead Washing Buffer (BWB)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Elute, Prime, Fragment Mix (EPF)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Elution Buffer (ELB)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
RNA Purification Beads (RPB)	48反応あたり 1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
RBP (RNA Bead Plate) バーコードラベル	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル0.3 mL PCRプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	3	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	6	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	6	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：

- Bead Binding Buffer
- Bead Washing Buffer
- Elution Buffer
- Elute, Prime, Fragment Mix
- Resuspension Buffer



注記

Resuspension Bufferは一度融解した後、2°C~8°Cで保存可能です。



注記

このステップで使用したBead Binding Buffer、Bead Washing Buffer、およびElution Bufferは後で再び使用するため2°C~8°Cに置いておきます。

- ▶ RNA Purification Beadsのチューブを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。

- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを設定しておきます：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 65°C 5分間、4°Cホールド—mRNA Denaturationとして保存
 - 80°C 2分間、25°Cホールド—mRNA Elution 1として保存
 - 94°C 8分間、4°Cホールド—Elution 2 - Frag - Primeとして保存



注記

120~200 bp、中央値150 bpよりも大きいインサートサイズの場合は、付録B 代替の断片化法を参照してください。

- ▶ 遠心機が冷却されている場合は15°C~25°Cにします。
- ▶ 96ウェル0.3 mL PCRプレートにRBPバーコードラベルを貼ります。

RBPの調製

- 1 RBPバーコードラベルを貼った新しい96ウェル0.3 mL PCRプレート中で、ヌクレアーゼフリー超純水を用い、最終溶液量が50 µLになるようにtotal RNAを希釈します。
- 2 室温に戻したRNA Purification Beadsチューブをボルテックスにより激しく混合し、オリゴ-dTビーズを再懸濁します。
- 3 RBPプレートの各ウェルに50 µLのRNA Purification Beadsを加え、オリゴ-dTビーズにポリA RNAを結合させます。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 4 RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

RBPのインキュベーション1

- 1 シールしたRBPプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、mRNA Denaturation (65°C 5分間、4°Cホールド) を選択してRNAを変性させ、ポリA RNAのビーズへの結合を促進します。
- 2 サーマルサイクラーが4°Cに達したらRBPプレートを取り出します。
- 3 実験台の上にRBPプレートを置き、室温で5分間インキュベートしてビーズにRNAを結合させます。

RBPの洗浄

- 1 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分置き、ポリA RNAが結合した磁気ビーズを反応液から分離します。
- 3 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。
- 4 マグネットスタンドからRBPプレートを外します。
- 5 RBPプレートの各ウェルに200 µLのBead Washing Bufferを加えて洗浄し、結合しなかったRNAを除去します。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 6 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置きます。
- 7 融解したElution Bufferを600 × gで5秒間遠心します。

- 8 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。ほとんどのリボゾームRNAと非mRNAは上清中に存在しています。
- 9 マグネットスタンドからRBPプレートを外します。
- 10 RBPプレートの各ウェルに50 μ LのElution Bufferを加えます。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 11 RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
- 12 Elution Bufferチューブは4°Cで保管します。

RBPのインキュベーション2

- 1 シールしたRBPプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、**mRNA Elution 1** (80°C 2分間、25°Cホールド) を選択してビーズからRNAを溶出します。この操作によりmRNA、およびビーズへ非特異的に結合していた混入rRNAの両方が解離します。
- 2 サーマルサイクラーが25°Cに達したらRBPプレートを取り出します。
- 3 実験台上でRBPプレートを室温に置きます。
- 4 RBPプレートから粘着シールをはがします。

RFPの調製

- 1 融解したBead Binding Bufferを600 \times gで5秒間遠心します。
- 2 RBPプレートの各ウェルに50 μ LのBead Binding Bufferを加えます。この操作により、mRNAがビーズへ特異的に再結合し、非特異的にビーズへ結合するrRNAの量が抑えられます。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 3 RBPプレートを室温で5分間インキュベートし、Bead Binding Bufferは2°C~8°Cで保管します。
- 4 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置きます。
- 5 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。
- 6 マグネットスタンドからRBPプレートを外します。
- 7 RBPプレートの各ウェルに200 μ LのBead Washing Bufferを加えて洗浄します。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 8 Bead Washing Bufferは2°C~8°Cで保管します。
- 9 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置きます。
- 10 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。上清には、1回目の溶出液中に存在したrRNAおよびその他のコンタミネーション要因のうち、ビーズに再結合しなかった残渣が含まれています。
- 11 マグネットスタンドからRBPプレートを外します。

- 12 RBPプレートの各ウェルに19.5 μ LのElute、Prime、Fragment Mixを加えます。溶液全体を静かに6回上下にピペッティングし、完全に混和します。Elute、Prime、Fragment MixはRTプライミング用のランダムヘキサマーを含み、第1鎖cDNA合成反応バッファーとして働きます。
- 13 RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
- 14 Elute、Prime、Fragment Mixのチューブは-25°C~-15°Cで保管します。

RFPのインキュベーション

- 1 シールしたRBPプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、**Elution 2 - Frag - Prime** (94°C 8分間、4°Cホールド) を選択し、RNAの溶出、断片化、およびプライミングを行います。
- 2 サーマルサイクラーが4°Cに達したらRBPプレートを取り出しスピンドウンします。
- 3 ただちに20ページ、第1鎖cDNAの合成へ進みます。

第1鎖cDNAの合成

本プロセスでは、逆転写酵素およびランダムプライマーを使用し、断片化されランダムヘキサマーでプライミングされたRNAフラグメントを第1鎖cDNAへ逆転写します。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
First Strand Master Mix (FSM)	1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
CDP (cDNA Plate)バーコードラベル	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル 0.3 mL PCRプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップ チューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	1	15°C~30°C	ユーザー
SuperScript II Reverse Transcriptase	1チューブ	-25°C~-15°C	ユーザー

事前準備

- ▶ -25°C~-15°Cの保管場所からFirst Strand Master Mixチューブを1本取り出し、室温で融解します。



注記

SuperScript IIを加えた First Strand Master Mixは、凍結融解をしても安定であり、後の実験に使用することができます。6回以上凍結融解を繰り返すと予想される場合は、First Strand Master Mixを少量ずつ分注し-25°C~-15°Cで保管します。

- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを予め設定し1st Strandとして保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 25°C 10分間
 - 42°C 50分間
 - 70°C 15分間
 - 4°C ホールド
- ▶ 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにCDPバーコードラベルを貼ります。

CDPの調製

- 1 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置きます。プレートをマグネットスタンドから外さないでください。
- 2 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 3 RBPプレートの各ウェルから17 μ Lの上清（断片化されプライミングされたmRNA）を取り、CDPバーコードでラベルした新しい0.3 mL PCRプレートの対応するウェルに移します。
- 4 融解したFirst Strand Master Mixのチューブを600 \times gで5秒間遠心します。
- 5 50 μ LのSuperScript IIをFirst Strand Master Mixのチューブに加えます。First Strand Master Mixチューブの試薬を全量使用しない場合は、9 μ LのFirst Strand Master Mixに対し1 μ Lの割合でSuperScript IIを加えます。穏やかにかつ完全に混和し、スピンドウンします。SuperScript IIを加えたことが分かるようにFirst Strand Master Mixチューブをラベルします。
- 6 CDPプレートの各ウェルに、First Strand Master MixとSuperScript IIの混合溶液を8 μ L加えます。溶液全体を静かに6回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 7 CDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、スピンドウンします。
- 8 First Strand Master Mixチューブは使用後速やかに-25°C~-15°Cの保管場所へ戻します。

CDPのインキュベーション1

- 1 シールしたCDPプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、1st Strandのプログラムを選択して反応を開始します。
 - a ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - b 25°C 10分間
 - c 42°C 50分間
 - d 70°C 15分間
 - e 4°C ホールド
- 2 サーマルサイクラーが4°Cに達したらCDPプレートを取り出し、ただちに22ページ、第2鎖cDNAの合成へ進みます。

第2鎖cDNAの合成

本プロセスではRNAテンプレートを除去して置換鎖を合成し、ds cDNAを生成します。AMPure XPビーズを使用し、第2鎖合成反応溶液からds cDNAを精製します。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
Second Strand Master Mix (SSM)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
IMP (Insert Modification Plate) バーコードラベル	プレートあたり 1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル0.3 mL PCRプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XP ビーズ	サンプルあたり 90 µL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール(EtOH)、用時調製	サンプルあたり 400 µL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	2	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	4	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップ チューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	4	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ Second Strand Master Mixを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します。
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスのHandling Magnetic Beadsを確認しておきます。イルミナのウェブサイトではTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、追加リソースを参照してください。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ サーマルサイクラーの温度を16°Cにしておきます。
- ▶ 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにIMPバーコードラベルを貼ります。

SSMの添加

- 1 融解したSecond Strand Master Mixを600 × gで5秒間遠心します。
- 2 CDPプレートから粘着シールをはがします。
- 3 CDPプレートの各ウェルに25 μLの融解したSecond Strand Master Mixを加えます。溶液全体を静かに6回上下にピペッティングし、完全に混和します。
- 4 CDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

CDPのインキュベーション2

- 1 シールしたCDPプレートを予め16°Cにしたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、16°Cで1時間インキュベートします。
- 2 サーマルサイクラーからCDPプレートを取り出し、実験台の上に置きます。
- 3 CDPから粘着シールをはがします。
- 4 そのままCDPプレートを静置し室温に戻します。

CDPの精製

- 1 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 2 十分に混和したAMPure XPビーズ90 μLを、50 μLのds cDNAが入ったCDPプレートの各ウェルに加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペッティングし、完全に混和します。
- 3 CDPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 4 CDPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置き、すべてのビーズがウェルの側壁に集まるようにします。
- 5 CDPプレートの各ウェルから135 μLの上清を取り除き廃棄します。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（6～8）は、CDPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 6 CDPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μLの用時調製80% EtOHを加えます。
- 7 CDPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 8 ステップ6および7を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 9 CDPプレートを室温で15分間乾燥させた後、マグネットスタンドから外します。
- 10 融解し、室温に戻したResuspension Bufferを600 × gで5秒間遠心します。
- 11 CDPプレートの各ウェルに52.5 μLのResuspension Bufferを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペッティングし、完全に混和します。
- 12 CDPプレートを室温で2分間インキュベートします。

- 13 CDPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間置きます。
- 14 CDPプレートから50 μ Lの上清 (ds cDNA) を取り、IMPバーコードでラベルした新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートに移します。



安全なストップポイント

ただちに25ページ、エンドリペアへ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。


末端修復

本プロセスでは、End Repair Mixを使用し、断片化によって生じたオーバーハングを平滑末端に変換します。End Repair Mixが持つ3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって3'オーバーハングを除去し、ポリメラーゼ活性によって5'オーバーハングをフィルインします。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
End Repair Mix (ERP)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
[オプション] End Repair Control (CTE)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
ALP (Adapter Ligation Plate)バーコードラベル	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル0.3 mL PCRプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XPビーズ	サンプルあたり 160 μL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール(EtOH)、用時調製	サンプルあたり 400 μL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	2	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップ チューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：
 - End Repair Control
 -  注記
End Repair Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます。
 - End Repair Mix
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスの*Handling Magnetic Beads*を確認しておきます。イルミナのウェブサイトTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、*追加リソース*を参照してください。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ 23ページ、*CDPの精製*を行った後にプレートを保存していた場合は、IMPプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温に置いて融解します。
 - 融解したIMPプレートを280 × gで1分間遠心します。
 - 融解したIMPプレートから粘着シールをはがします。
- ▶ サーマルサイクラーを30°Cに予熱しておきます。
- ▶ サーマルサイクラーのヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定します。
- ▶ 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにALPバーコードラベルを貼ります。

IMPの調製

- 1 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 融解したEnd Repair Controlのチューブを600 × gで5秒間遠心します。
 - 使用前にEnd Repair ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（例：1 μL End Repair Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したEnd Repair Controlは廃棄します。
 - 50 μLのds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに、希釈したEnd Repair Controlを10 μL加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合、50 μLのds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに、10 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 2 ds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに40 μLのEnd Repair Mixを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 3 IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

IMPのインキュベーション

- 1 シールしたIMPプレートを、予熱しておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、30°Cで30分間インキュベートします。
- 2 IMPプレートをサーマルサイクラーから取り出します。

IMPの精製

- 1 IMPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 3 十分に混和したAMPure XPビーズ160 μL を、100 μL のEnd Repair Mixが入ったIMPプレートの各ウェルに加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 4 IMPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 5 IMPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 6 127.5 μL にセットした200 μL シングルチャンネルピペットまたはマルチチャンネルピペットを使用し、IMPプレートの各ウェルから127.5 μL の上清を取り除き廃棄します。
- 7 ステップ6を1回繰り返す。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（8～10）は、IMPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 8 IMPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μL の用時調製80% EtOHを加えます。
- 9 IMPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。ビーズを乱さないよう注意してください。
- 10 ステップ8および9を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 11 IMPプレートを室温で15分間乾燥させた後、マグネットスタンドから外します。
- 12 IMPプレートの各ウェルに17.5 μL のResuspension Bufferを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 13 IMPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 14 IMPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 15 IMPプレートの各ウェルから15 μL の上清を取り、ALPバーコードでラベルした新しい0.3 mL PCRプレートの対応するウェルに移します。



安全なストップポイント

ただちに28ページ、3'末端のアデニル化へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、 -25°C ～ -15°C で保管します（最長7日間まで）。


3'末端のアデニル化

平滑末端を持つフラグメントの3'末端に1塩基の「A」ヌクレオチドを付加し、アダプターライゲーション中にフラグメント同士がライゲーションすることを防ぎます。アダプターの3'末端に存在する1塩基の「T」ヌクレオチドが相補的なオーバーハングとなり、アダプターとフラグメントのライゲーションが起きます。この戦略を用いることにより、キメラ（連結されたテンプレート）の生成率を低く抑えられます。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
A-Tailing Mix (ATL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
[オプション] A-Tailing Control (CTA)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	3	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	3	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を用意します。
- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。室温で融解した後、氷上に置きます：
 - A-Tailing Control
 -  注記
A-Tailing Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます
 - A-Tailing Mix
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ 27ページ、IMPの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、ALPプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解します。
 - 融解したALPプレートを280 × gで1分間遠心します。
 - ALPプレートから粘着シールをはがします。

- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを予め設定しATAIL70として保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 37°C 30分間
 - 70°C 5分間
 - 4°C ホールド

ATLの添加

- 1 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 融解したA-Tailing Controlのチューブを600 × gで5秒間遠心します。
 - 使用前にA-Tailing ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（例：1 μL A-Tailing Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したA-Tailing Controlは廃棄します。
 - ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの希釈したA-Tailing Controlを加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合、ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 2 ALPプレートの各ウェルに12.5 μLの溶解したA-Tailing Mixを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 3 ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

ALPのインキュベーション1

- 1 シールしたALPプレートを、予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、ATAIL70を選択してランを開始します。
 - a ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - b 37°C 30分間
 - c 70°C 5分間
 - d 4°C ホールド
- 2 サーマルサイクラーの温度が4°Cに達したら、ALPプレートをサーマルサイクラーから取り出し、ただちに30ページ、アダプターのライゲーションへ進みます。


アダプターのライゲーション

本プロセスでは、ds cDNAの末端にインデックスアダプターを結合させ、フローセル表面にハイブリダイズ可能な状態にします。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Ligation Mix (LIG)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
RNA Adapter Indexes (AR001-AR016, AR018- AR023, AR025, AR027)	使用する各インデックスを1列 8反応につき1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Stop Ligation Buffer (STL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
[オプション] Ligation Control (CTL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
以下のバーコードラベル： • CAP (Clean Up ALP Plate) • PCR (Polymerase Chain Reaction)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル0.3 mL PCRプレート	2	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XP ビーズ	サンプルあたり92 μL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール (EtOH) 、 用時調製	サンプルあたり800 μL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	3	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬 リザーバー (マルチチャンネルピペット を使用する場合)	4~28	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連 ストリップチューブおよび キャップ (マルチチャンネルピペット を使用する場合)	4~28	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：
 - Ligation Control
- 
 注記
 Ligation Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます。
- 使用するインデックスのRNA Adapter Indexチューブ
- Stop Ligation Buffer
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスのHandling Magnetic Beadsを確認しておきます。イルミナのウェブサイトでTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、[追加リソースを参照してください](#)。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ 以下のようにサーマルサイクラーを予めプログラムしておきます：
 - サーマルサイクラーのヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 30°C 10分間
- ▶ 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにCAPバーコードラベルを貼ります。
- ▶ 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにPCRバーコードラベルを貼ります。



注記

ライブラリーをインデックス化する際、後で同じプールに混ぜ合わせるサンプルは、横1列のウェルに並べておくことを推奨します。また、縦1列には同じインデックスを加えるようにします。このように配置しておくこと、後でインデックスアダプターを加える際およびインデックス化したライブラリーをプールする際にピペット操作が容易になります。

LIGの添加

- 1 融解したRNA Adapter Indexチューブ、Ligation Control（Ligation Controlを使用する場合）、およびStop Ligation Bufferチューブを600 × gで5秒間遠心します。
- 2 使用する直前にLigation Mixチューブを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
- 3 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 4 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 使用前にLigation ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（1 μL Ligation Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したLigation Controlは廃棄します。
 - ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの希釈したLigation Controlを加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合、ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 5 ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのLigation Mixを加えます。
- 6 Ligation Mixのチューブは、使用后速やかに-25°C~-15°Cの保管場所へ戻します。
- 7 ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの融解したRNA Adapter Indexを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 8 ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

ALPのインキュベーション2

- 1 ALPプレートを、予熱しておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、30°Cで10分間インキュベートします。
- 2 ALPプレートをサーマルサイクラーから取り出します。

STLの添加

- 1 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ALPプレートの各ウェルに5 μ LのStop Ligation Bufferを加え、ライゲーション反応を不活性化します。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。

ALPの精製

- 1 AMPure XPビーズを少なくとも1分間、またはビーズが十分に拡散するまでボルテックスします。
- 2 ALPプレートの各ウェルに、混合したAMPure XPビーズを42 μ L加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 3 ALPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 4 ALPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 5 ALPプレートの各ウェルから79.5 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（6~8）は、ALPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 6 ALPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。
- 7 ALPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 8 ステップ6および7を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 9 ALPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾します。
- 10 ALPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 11 ALPプレートの各ウェルに52.5 μ LのResuspension Bufferを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし完全に混和するか、またはビーズが完全に再懸濁されるまで混和します。
- 12 ALPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 13 ALPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温に5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 14 ALPプレートの各ウェルから50 μ Lの上清を取り、CAPバーコードでラベルした新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートの対応するウェルに移します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。

- 15 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 16 CAPプレートの各ウェルに、混合したAMPure XPビーズを50 μ L加え、2回目の精製を行います。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 17 CAPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 18 CAPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 19 CAPプレートの各ウェルから95 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。

**注記**

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ (20~22) は、CAPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 20 CAPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 21 CAPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 22 ステップ20および21を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 23 CAPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾した後、プレートをマグネットスタンドから外します。
- 24 CAPプレートの各ウェルに22.5 μ LのResuspension Bufferを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし完全に混和するか、またはビーズが完全に再懸濁されるまで混和します。
- 25 CAPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 26 CAPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温に5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 27 CAPプレートの各ウェルから20 μ Lの上清を取り、PCRバーコードでラベルした新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートの対応するウェルに移します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。

**安全なストップポイント**

ただちに34ページ、DNAフラグメントの濃縮へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、PCRプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。

DNAフラグメントの濃縮

本プロセスでは、両端にアダプター分子を持つDNAフラグメントをPCRによって選択的に濃縮し、ライブラリー中のDNA量を増やします。PCRは、アダプター末端にアニールするPCRプライマーカクテルを用いて実施します。ライブラリー中でのPCRによる偏りを避けるため、PCRのサイクル数は最小限に抑えます。



注記

PCRにより、両端にアダプターが結合したフラグメントが濃縮されます。末端にアダプターが1つしかないまたは全くないフラグメントは、ライゲーションの効率が不十分なために生じる副生成物です。どちらのフラグメントもクラスター形成には使用できません。アダプターを全く持たないフラグメントは、フローセル表面のプライマーにハイブリダイズできません。片方の末端のみに1つのアダプターを持つフラグメントは、フローセル表面のプライマーにハイブリダイズ可能ですがクラスターを形成できません。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
PCR Master Mix (PMM)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
PCR Primer Cocktail (PPC)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
TSP1 (Target Sample Plate) パーコードラベル	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェル 0.3 mL PCRプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XPビーズ	サンプルあたり50 µL	2°C~8°C	ユーザー
80% エタノール (EtOH)、 用時調製	サンプルあたり400 µL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	2	15°C~30°C	ユーザー
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連 ストリップチューブおよび キャップ (マルチチャンネル ピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リ ザーパー (マルチチャンネル ピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を用意します。
- ▶ PCR Master MixおよびPCRプライマーカクテルを、-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。室温で融解した後、氷上に置きます。
- ▶ 融解したPCR Master MixおよびPCRプライマーカクテルのチューブを600×gで5秒間遠心します。
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ AMPure XP ビーズを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスのHandling Magnetic Beadsを確認してください。イルミナのウェブサイトTruSeq RNAサンプル調製v2に関するベストプラクティスへアクセスする方法については、8ページ、追加リソースを参照してください。
- ▶ 32ページ、ALPの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、PCRプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解します。
 - 融解したPCRプレートを280×gで1分間遠心します。
 - 融解したPCRプレートから粘着シールをはがします。
- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを予め設定しPCRとして保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 98°C 30秒間
 - 以下を15サイクル：
 - 98°C 10秒間
 - 60°C 30秒間
 - 72°C 30秒間
 - 72°C 5分間
 - 10°C ホールド
- ▶ 新しい96ウェル 0.3 mL PCRプレートをTSP1バーコードラベルを貼ります。

PCRの調製

- 1 PCRプレートの各ウェルに5 μLの融解したPCRプライマーカクテルを加えます。
- 2 PCRプレートの各ウェルに25 μLの融解したPCR Master Mixを加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 3 PCRプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。

PCR増幅

- 1 シールしたPCRプレートを予めプログラムしたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、PCRを選択してランを開始し、増幅を行います。
 - a ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - b 98°C 30秒間

- c 以下を15サイクル：
 - 98°C 10秒間
 - 60°C 30秒間
 - 72°C 30秒間
- d 72°C 5分間
- e 10°C ホールド

PCRの精製

- 1 PCRプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 3 混和したAMPure XPビーズ50 μ Lを、PCR増幅ライブラリー50 μ Lが入ったPCRプレートの各ウェルに加えます。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 4 PCRプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 5 PCRプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 6 PCRプレートの各ウェルから95 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（7～9）は、PCRプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 7 PCRプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。
- 8 PCRプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 9 ステップ7および8を1回繰り返す、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 10 PCRプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾した後、プレートをマグネットスタンドから外します。
- 11 乾燥させた各ウェルのペレットを32.5 μ LのResuspension Bufferで再懸濁します。溶液全体を静かに10回上下にピペティングし完全に混和します。
- 12 PCRプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 13 PCRプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 14 PCRプレートの各ウェルから30 μ Lの透明な上清を取り、TSP1バーコードでラベルした新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートの対応するウェルに移します。



安全なストップポイント

ただちに37ページ、ライブラリーの検証へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、TSP1プレートを Microseal 「B」 粘着シールで密封し、-25°C～-15°Cで保管します（最長7日間まで）。

ライブラリーの検証

以下の作業を行い、作製したサンプルライブラリーのクオリティ制御解析、およびDNAライブラリーテンプレートの定量を実施することを推奨します。

ライブラリーの定量

イルミナのシーケンスプラットフォームで最高品質のデータを得るためには、フローセルのすべてのレーンにわたり最適なクラスター密度を実現することが重要です。クラスター密度を最適化するためにはDNAライブラリーテンプレートの正確な定量が欠かせません。イルミナの『*Sequencing Library qPCR Quantification Guide*』（パーツ番号：11322363）に従い、qPCRによるライブラリーの定量を行ってください。



注記

イルミナのウェブサイトから『*Sequencing Library qPCR Quantification Guide*』（パーツ番号：11322363）をダウンロードする方法については、8ページ、追加リソースを参照してください。

クオリティ制御

- 1 以下のいずれかを行います：
 - Agilent DNA 1000等、DNA用ラボチップを使用し、1 μ Lの再懸濁したライブラリーをアジレント・テクノロジー社の2100 バイオアナライザで泳動します。
 - 1 μ Lの再懸濁したライブラリーに1 μ LのRSBを加えて希釈し、Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kitを使用してAdvanced Analytical Fragment Analyzerで泳動します。

- 2 サンプルのサイズと純度を確認します。最終的な産物はおよそ260 bp付近（シングルリード用ライブラリーの場合）にバンドとして存在するはずです。

図4 TruSeq RNAサンプル調製v2におけるライブラリーのサイズ分布例

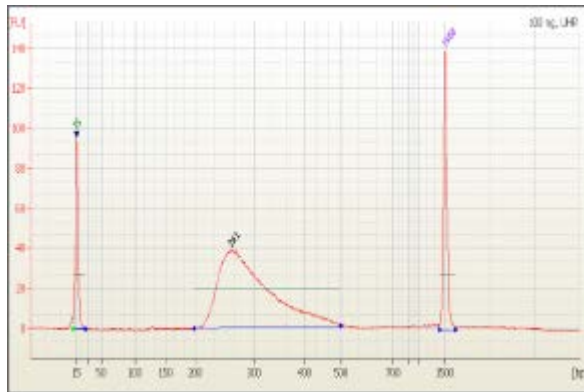
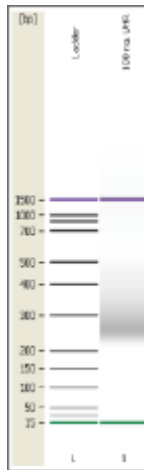


図5 TruSeq RNAサンプル調製v2における260 bpのPCR産物



ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング

本プロセスでは、クラスター形成のためのDNAテンプレートを調製する方法について述べます。インデックス化したDNAライブラリーをDCTプレート中で10 nMにノーマライズした後、PDPプレート中で等量ずつプールします。インデックスを付加していないDNAライブラリーは、DCTプレート中で10 nMにノーマライズします。

試薬および消耗品


アイテム	数量	保管条件	供給元
以下のバーコードラベル： • DCT (Diluted Cluster Template) • PDP (Pooled DCT Plate) (プーリングを行う場合のみ)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
96ウェル0.3 mL PCRプレート (プーリングを行う場合のみ)	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	2	15°C~30°C	ユーザー
Tris-HCl 10 mM、pH8.5、0.1% Tween 20	各ライブラリーの濃度を 10 nMにノーマライズする のに充分な量	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 36ページ、PCRの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、TSP1プレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解します。
 - 融解したTSP1プレートを280 × gで1分間遠心します。
 - TSP1プレートから粘着シールをはがします。
- ▶ 『TruSeq Sample Preparation Pooling Guide』（パーツ番号：15042173）を確認しておきます。イルミナのウェブサイトからガイドをダウンロードする方法については、19ページ、追加リソースを参照してください。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにDCTバーコードラベルを貼ります。
- ▶ [プーリングを行う場合のみ] 新しい96ウェル0.3 mL PCRプレートにPDPバーコードラベルを貼ります。

DCTの調製

- 1 TSP1プレートの各ウェルから10 μ Lのサンプルライブラリーを取り、DCTバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
- 2 Tris-HCl 10 mM、pH 8.5、0.1% Tween 20を用い、DCTプレートの各ウェルに入っているサンプルライブラリーの濃度を10 nMにノーマライズします。



注記
各サンプルライブラリー収量の定量結果により、DCTプレートの最終溶液量は10~400 μ Lとなります。
- 3 ノーマライズしたサンプルライブラリー溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 4 作製するライブラリーのタイプにより、以下のいずれかを行います：
 - プーリングを行わないライブラリーの場合、プロトコールはここで終了です。以下のいずれかを行います：
 - クラスター形成に進みます。詳細については、使用するイルミナプラットフォームのユーザーガイドにおいてクラスター形成に関するセクションを参照してください。
 - DCTプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します。
 - ライブラリーをプーリングする場合、PDPの調製（プーリングを行う場合のみ）へ進みます。


PDPの調製（プーリングを行う場合のみ）



注記

プーリングを行わない場合、PDPプレートは調製しないでください。

- 1 各プールで混ぜ合わせるサンプルの数を決めます。
- 2 プールする予定のノーマライズ済みサンプルライブラリーについて、各10 μ LずつをDCTプレートから取り、PDPバーコードでラベルした新しい0.3 mL PCRプレートの1ウェルに移します。PDPプレートの各ウェルにおける溶液の総量は、混ぜ合わせたサンプル数の10倍であり、20~240 μ L（2~24ライブラリー）となります。例えば、2サンプルの場合の溶液量は20 μ Lであり、12サンプルでは120 μ L、24サンプルでは240 μ Lとなります。



注記
同じインデックスを持つサンプルをプーリングしないでください。
- 3 溶液全体を静かに10回上下にピペティングし、完全に混和します。
- 4 以下のいずれかを行います：
 - クラスター形成へ進みます。詳細については、使用するイルミナシーケンスプラットフォームのユーザーガイドにおいてクラスター形成のセクションを参照してください。
 - PDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します。

High Sample (HS) プロトコール

はじめに	42
サンプル調製ワークフロー	43
アダプターセットアップの準備	44
mRNAの精製および断片化	45
第1鎖cDNAの合成	51
第2鎖cDNAの合成	53
エンドリペア	56
3'末端のアデニル化.....	60
アダプターのライゲーション	62
DNAフラグメントの濃縮	67
ライブラリーの検証.....	71
ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング	73



はじめに

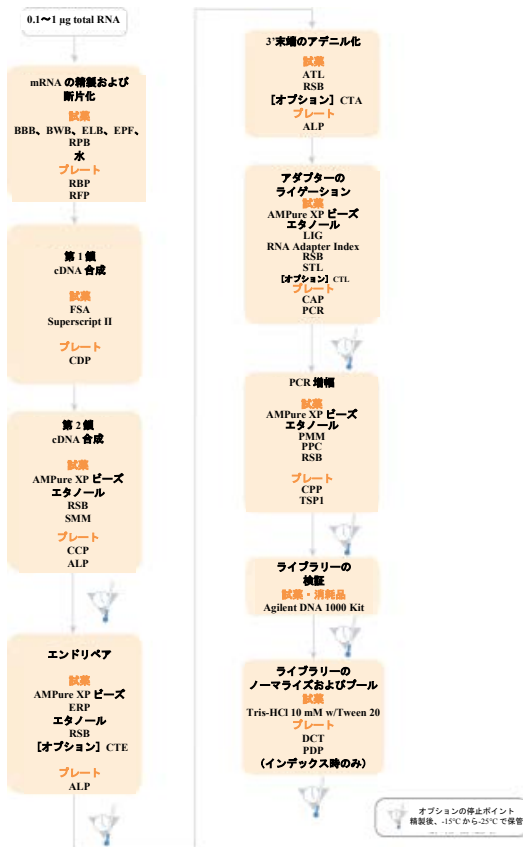
本章ではTruSeq RNAサンプル調製 v2 HSプロトコールについて述べます。一度に処理するサンプル数が48を超える場合、本プロトコールを推奨します。一度に処理するサンプル数が48以下の場合、第2章 Low Sample (LS)プロトコールを推奨します。

- ▶ 記述されている順序通りプロトコールに従い、指定された容量およびインキュベーション条件を使用します。
- ▶ 開始する前に以下を確認してください：
 - ベストプラクティス-8ページ、追加リソースで、イルミナのウェブサイトのTruSeq RNAサンプル調製 v2ベストプラクティスにアクセスする方法を確認してください。
 - 付録A 補足情報-キットの内容を確かめ、HSプロトコールに必要な機器および消耗品がすべて揃っていることを確認してください。

サンプル調製ワークフロー

24種類のインデックスアダプターを使用してテンプレートを調製するか、TruSeq RNAサンプル調製v2 HSプロトコルのワークフローを以下に示します。

図6 TruSeq RNAサンプル調製 v2 HSワークフロー



アダプターセットアップの準備

プーリングを行う場合、ライブラリー調製を始める前にIEMまたはAnalysis Software (AS)を使用し、サンプルに関する情報を記録しておきます。

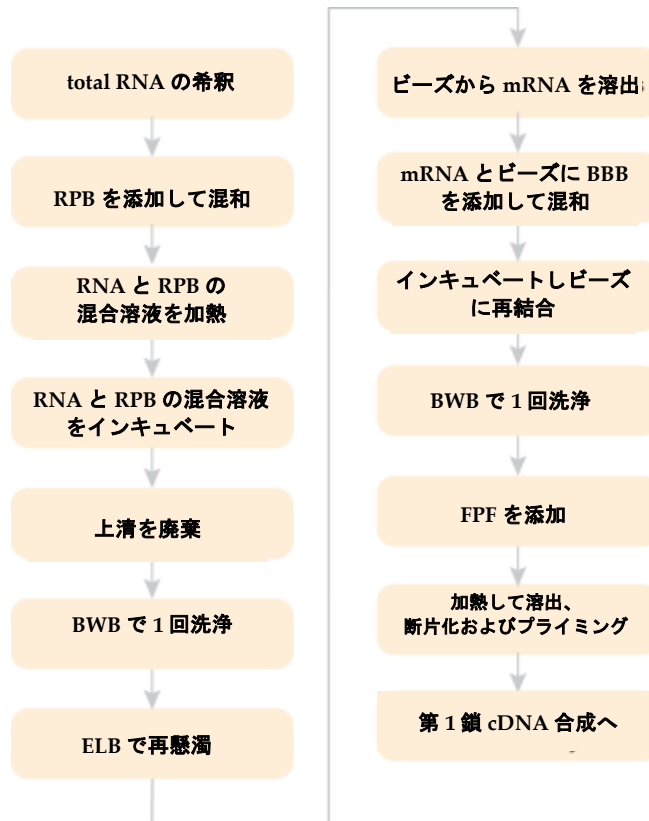
- ▶ 以下のいずれかを行います：
 - IEMを使用し、イルミナのシーケンサーおよび解析ソフトウェアで使用するサンプルシートを作製および編集します。イルミナのウェブサイトからIEMソフトウェアおよび説明書をダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。
 - Analysis Software (AS)を使用し、イルミナのシーケンサーおよび解析ソフトウェア用に、サンプル、ライブラリー、プール、およびランの管理を行います。BaseSpaceへのアクセス方法、またはイルミナのウェブサイトからBaseSpaceの説明書をダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。
- ▶ 『*TruSeq Sample Preparation Pooling Guide*』（パーツ番号：15042173）で、プランニングステップについて確認してください。イルミナのウェブサイトから同ガイドをダウンロードする方法については8ページ、*追加リソース*を参照してください。

後で同じプールに混ぜ合わせるサンプルは、横1列のウェルに並べておくことを推奨します。また、縦1列には同じインデックスを加えるようにします。このように配置しておく、後でインデックスアダプターを加える際およびインデックス化したライブラリーをプールする際にピペット操作が容易になります。

mRNAの精製および断片化

本プロセスでは、オリゴ-dTを結合させた磁気ビーズを使用して精製を2ラウンド行い、ポリA配列を持つmRNAを精製します。2回目のポリA RNA溶出を行う際に、RNAの断片化およびcDNA合成に向けたプライミングを行います。精製ステップを行う間、以下の図を参照してください。

図7 TruSeq RNAサンプル調製v2 精製ワークフロー



再現性を確保するため、上記の手順を厳密に守ることが重要です。



注記

マグネットスタンド上に5分間置き、ビーズを完全にペレット化させます。マグネットスタンド上でビーズがペレット状になっている間に、速やかに上清をビーズから除去します。ペレットを乾燥させないでください。



注記

このプロセスでは0.1~1 µgのtotal RNAを用い、PCRプレートとプレート用マグネットスタンドの使用を推奨します。またはすでに精製された10~100 ngのmRNAからスタートすることもできます。その場合、Elute、Prime、Fragment Mixへ加える前に、エタノール沈殿またはQIAGEN MinEluteカラムによりmRNAを5 µL以下に濃縮しておく必要があります。

- エタノール沈殿を行った場合、ペレットを18 µLのElute、Prime、Fragment Mixに溶かします。
- QIAGEN MinEluteカラムを使用した場合、mRNAを5 µLの分子生物学用水で溶出し、13 µLのElute、Prime、Fragment Mixを加えます。溶出のボリュームが少ないため、MinEluteカラムを使用した場合は最大で50%のmRNAをロスすることがあります。

いずれの場合も、本プロセスの19ページ、RFPのインキュベーションにおいてmRNAをElute、Prime、Fragment Mix中で加熱し断片化を行います。




注記

120~200 bp、中央値150 bpよりも大きいインサートサイズの場合は、付録B 代替の断片化法を参照してください。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Bead Binding Buffer (BBB)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Bead Washing Buffer (BWB)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Elute, Prime, Fragment Mix (EPF)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Elution Buffer (ELB)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
RNA Purification Beads (RPB)	48反応あたり1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
以下のバーコードラベル： • RBP (RNA Bead Plate) • RFP (RNA Fragmentation Plate)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルHSPプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
Microseal「B」粘着シール	7	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー（マルチチャンネルピペットを使用する場合）	6	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ（マルチチャンネルピペットを使用する場合）	6	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を用意します。
 - ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：
 - Bead Binding Buffer
 - Bead Washing Buffer
 - Elution Buffer
 - Elute, Prime, Fragment Mix
 - Resuspension Buffer
-  注記
Resuspension Bufferは一度融解した後、2°C~8°Cで保存可能です。
-  注記
このステップで使用したBead Binding Buffer、Bead Washing Buffer、および Elution Bufferは後で使用するため2°C~8°Cに置いておきます。
- ▶ RNA Purification Beadsのチューブを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
 - ▶ マイクロヒーティングシステムを65°Cに予熱しておきます。
 - ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを設定し、**Elution 2 - Frag - Prime**として保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 94°C 8分間
 - 4°C ホールド
 - ▶ ストロボスコープを使用し、マイクロプレートシェーカーが適切に1,000 rpmへキャリブレーションされていることを確認します。
 - ▶ 遠心機が冷却されている場合は15°C~25°Cにします。
 - ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにRBPバーコードラベルを貼ります。
 - ▶ 新しい96ウェルHSPプレートにRFPバーコードラベルを貼ります。

RBPの調製

- 1 RBPバーコードラベルを貼った新しい96ウェルMIDIプレート中で、ヌクレアーゼフリー超純水を用い、最終溶液量が50 μ Lになるようtotal RNAを希釈します。
- 2 室温に戻したRNA Purification Beadsチューブをボルテックスにより激しく混合し、オリゴ-dTビーズを再懸濁します。
- 3 RBPプレートの各ウェルに50 μ LのRNA Purification Beadsを加え、オリゴ-dTビーズにポリA RNAを結合させます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1,000 rpmで1分間連続して攪拌します。

RBPのインキュベーション1

- 1 シールしたRBPプレートを、予熱しておいたマイクロヒーティングシステムにセットします。カバーを閉め、65°Cで5分間インキュベートしてRNAを変性させ、ポリA RNAのビーズへの結合を促進します。
- 2 RBPプレートをマイクロヒーティングシステムから取り出し、氷上に1分間置きます。
- 3 RBPプレートを実験台の上に置き、室温で5分間インキュベートしてRNAをビーズに結合させます。
- 4 次のインキュベーションに使用するため、マイクロヒーティングシステムを80°Cに予熱しておきます。

RBPの洗浄

- 1 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置き、ポリA RNAが結合しているビーズを溶液から分離します。
- 3 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。
- 4 RBPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 5 RBPプレートの各ウェルに200 μ LのBead Washing Bufferを加えて洗浄し、ビーズに結合しなかったRNAを除去します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1,000 rpmで1分間連続して撹拌します。
- 6 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 7 RBPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置きます。
- 8 融解したElution Bufferを600 \times gで5秒間遠心します。
- 9 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。ほとんどのリボソームRNAおよび非mRNAは上清中に存在しています。
- 10 RBPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 11 RBPプレートの各ウェルに50 μ LのElution Bufferを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1分間連続して撹拌します。
- 12 Elution Bufferのチューブは4°Cで保管します。

RBPのインキュベーション2

- 1 シールしたRBPプレートを予熱しておいたマイクロヒーティングシステムにセットします。カバーを閉め、80°Cで2分間インキュベートし、ビーズからmRNAを溶出します。mRNAと、ビーズへ非特異的に結合していた混入rRNAが溶出されます。
- 2 RBPプレートをマイクロヒーティングシステムから取り出し、氷上に1分間置きます。
- 3 実験台上でRBPプレートを室温に置きます。
- 4 RBPプレートから粘着シールをはがします。

RFPの調製

- 1 融解したBead Binding Bufferを600 × gで5秒間遠心します。
- 2 RBPプレートの各ウェルに50 μLのBead Binding Bufferを加えます。この操作により、mRNAが特異的にビーズへ再結合し、同時にビーズへ非特異的に結合するrRNAの量が抑えられます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1,000 rpmで1分間連続して攪拌します。
- 3 RBPプレートを室温で5分間インキュベートし、Bead Binding Bufferは2°C~8°Cで保管します。
- 4 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 5 RBPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間置きます。
- 6 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。
- 7 RBPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 8 RBPプレートの各ウェルに200 μLのBead Washing Bufferを加えて洗浄します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1,000 rpmで1分間連続して攪拌します。
- 9 Bead Washing Bufferは2°C~8°Cで保管します。
- 10 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 11 RBPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間置きます。
- 12 RBPプレートの各ウェルから上清をすべて取り除き廃棄します。上清には、1回目の溶出液中に存在したrRNAおよびその他の混入物のうち、ビーズに再結合しなかった残渣が含まれています。
- 13 マグネットスタンドからRBPプレートを外します。

- 14 RBPプレートの各ウェルに19.5 μ LのElute、Prime、Fragment Mixを加えます。Elute、Prime、Fragment MixはRTプライミング用のランダムヘキサマーを含み、第1鎖cDNA合成反応溶液バッファーとして働きます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a RBPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、RBPプレートを1,000 rpmで1分間連続して攪拌します。
- 15 RBPプレートから粘着シールをはがします。
- 16 RBPプレートの各ウェルから溶液の全量を取り、RFPバーコードでラベルした新しいHSPプレートの対応するウェルに移します。
- 17 RFPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
- 18 Elute、Prime、Fragment Mixのチューブは-25°C~-15°Cで保管します。

RFPのインキュベーション

- 1 シールしたRFPプレートを、予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、**Elution 2 - Frag - Prime** (94°C 8分間、4°C ホールド) を選択してRNAの溶出、断片化、およびプライミングを行います。
- 2 サーマルサイクラーが4°Cに達したらRFPプレートを取り出し、スピンドウンします。
- 3 ただちに51ページ、第1鎖cDNAの合成へ進みます。

第1鎖cDNAの合成

本プロセスでは、逆転写酵素およびランダムプライマーを使用し、断片化されランダムヘキサマーでプライミングされたRNAフラグメントを第1鎖cDNAへ逆転写します。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
First Strand Master Mix (FSM)	1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
CDP (cDNA Plate)バーコードラベル	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルHSP プレート	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップ チューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	1	15°C~30°C	ユーザー
SuperScript II Reverse Transcriptase	1チューブ	-25°C~-15°C	ユーザー

事前準備

- ▶ First Strand Master Mixチューブ1本を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します。



注記

SuperScript IIを加えた First Strand Master Mixは、凍結融解をしても安定であり、後の実験に使用することができます。6回以上凍結融解を繰り返すと予想される場合は、First Strand Master Mixを少量ずつ分注し-25°C~-15°Cで保管します。

- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを予め設定し1st Strandとして保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 25°C 10分間
 - 42°C 50分間
 - 70°C 15分間
 - 4°C ホールド
- ▶ ストロボスコープを使用し、マイクロプレートシェーカーが適切に1,000 rpmへキャリブレーションされていることを確認します。
- ▶ 新しい96ウェルHSPプレートにCDPバーコードラベルを貼ります。

CDPの調製

- 1 RFPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間置きます。プレートをマグネットスタンドから外さないでください。
- 2 RFPプレートから粘着シールをはがします。
- 3 RFPプレートの各ウェルから17 μ Lの上清（断片化されプライミングされたmRNA）を取り、CDPバーコードでラベルした新しいHSPプレートの対応するウェルに移します。
- 4 融解したFirst Strand Master Mixのチューブを600 \times gで5秒間遠心します。
- 5 50 μ LのSuperScript IIをFirst Strand Master Mixのチューブに加えます。穏やかにかつ完全に混和し、スピンドウンします。First Strand Master Mixチューブの試薬を全量使用しない場合は、9 μ LのFirst Strand Master Mixに対し1 μ Lの割合でSuperScript IIを加えます。SuperScript IIを加えたことが分かるようにFirst Strand Master Mixチューブをラベルします。
- 6 CDPプレートの各ウェルに、First Strand Master MixとSuperScript IIの混合溶液を8 μ L加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CDPプレートを1,600 rpmで20秒間連続して攪拌します。
- 7 First Strand Master Mixチューブは使用後速やかに-25°C~-15°Cの保管場所へ戻します。

CDPのインキュベーション1

- 1 シールしたCDPプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、1st Strandのプログラムを選択して反応を開始します。
 - a ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - b 25°C 10分間
 - c 42°C 50分間
 - d 70°C 15分間
 - e 4°C ホールド
- 2 サーマルサイクラーが4°Cに達したらCDPプレートを取り出し、ただちに53ページ、第2鎖cDNAの合成へ進みます。

第2鎖cDNAの合成

本プロセスではRNAテンプレートを除去して置換鎖を合成し、ds cDNAを生成します。AMPure XPビーズを使用し、第2鎖合成反応溶液からds cDNAを精製します。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
Second Strand Master Mix (SSM)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
以下のバーコードラベル： • CCP (cDNA Clean Up Plate) • IMP (Insert Modification Plate)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルMIDIプレート	2	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XPビーズ	サンプルあたり90 μL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール(EtOH)、用時調製	サンプルあたり400 μL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	4	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	4	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	4	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ Second Strand Master Mixを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します。
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスのHandling Magnetic Beadsを確認しておきます。イルミナのウェブサイトでTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、追加リソースを参照してください。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ サーマルサイクラーの温度を16°Cにしておきます。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにCCPバーコードラベルを貼ります。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにIMPバーコードラベルを貼ります。

SSMの添加

- 1 融解したSecond Strand Master Mixを600 × gで 5秒間遠心します。
- 2 CDPプレートから粘着シールをはがします。
- 3 CDPプレートの各ウェルに25 μLの融解したSecond Strand Master Mixを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CDPプレートを1,600 rpmで20秒間連続して攪拌します。

CDPのインキュベーション2

- 1 シールしたCDPプレートを予め16°Cにしたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、16°Cで1時間インキュベートします。
- 2 サーマルサイクラーからCDPプレートを取り出し、実験台の上に置きます。
- 3 CDPから粘着シールをはがします。
- 4 そのままCDPプレートを静置し室温に戻します。

CDPの精製

- 1 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 2 十分に混和したAMPure XPビーズ90 μLを、CCPバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの各ウェルに加えます。
- 3 CDPプレートの各ウェルから溶液の全量を取り、AMPure XPビーズが入っているCCPプレートの対応するウェルに移します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CCPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CCPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 4 CCPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 5 CCPプレートを280 × gで1分間遠心します。
- 6 CCPプレートから粘着シールをはがします。
- 7 CCPプレートをマグネットスタンドにセットして室温に5分間置き、すべてのビーズがウェルの側壁に集まるようにします。
- 8 CCPプレートの各ウェルから135 μLの上清を取り除き廃棄します。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（9～11）は、CCPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 9 CCPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μLの用時調製80% EtOHを加えます。
- 10 CCPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 11 ステップ9および10を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。

- 12 CCPプレートを室温で15分間乾燥させた後、マグネットスタンドから外します。
- 13 融解し、室温に戻したResuspension Bufferを600 × gで5秒間遠心します。
- 14 CCPプレートの各ウェルに52.5 μLのResuspension Bufferを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CCPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CCPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 15 CCPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 16 CCPプレートを280 × gで1分間遠心します。
- 17 CCPプレートから粘着シールをはがします。
- 18 CCPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間置きます。
- 19 CCPプレートから50 μLの上清(ds cDNA)を取り、IMPバーコードでラベルした新しいMIDIプレートに移します。



安全なストップポイント

ただちに56ページ、エンドリペアに進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。

エンドリペア

本プロセスでは、End Repair Mixを使用し、断片化によって生じたオーバーハングを平滑末端に変換します。End Repair Mixが持つ3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって3'オーバーハングを除去し、ポリメラーゼ活性によって5'オーバーハングをフィルインします。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管温度	供給元
End Repair Mix (ERP)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
[オプション] End Repair Control (CTE)	48反応あたり 1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
ALP (Adapter Ligation Plate)バーコードラベル	プレートあたり 1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XP ビーズ	サンプルあたり 160 μL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール(EtOH)、用時調製	サンプルあたり 400 μL	15°C~30°C	ユーザー
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	4	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップ チューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を準備します。
- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：

- End Repair Control



注記

End Repair Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます。

- End Repair Mix
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスの*Handling Magnetic Beads*を確認しておきます。イルミナのウェブサイトTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、*追加リソース*を参照してください。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ 54ページ、*CDPの精製*を行った後にプレートを保存していた場合は、IMPプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温に置いて融解します。
 - 融解したIMPプレートを280 × gで1分間遠心します。
 - 融解したIMPプレートから粘着シールをはがします。
- ▶ サーマルサイクラーを30°Cに予熱しておきます。
- ▶ ストロボスコープを使用してマイクロプレートシェーカーのキャリブレーションを行い、1,800 rpmにセットします。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにALPバーコードラベルを貼ります。

IMPの調製

- 1 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 融解したEnd Repair Controlのチューブを600 × gで5秒間遠心します。
 - 使用前にEnd Repair ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（1 μL End Repair Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したEnd Repair Controlは廃棄します。
 - 50 μLのds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに、希釈したEnd Repair Controlを10 μL加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合は、50 μLのds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに、10 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 2 ds cDNAが入っているIMPプレートの各ウェルに、40 μLのEnd Repair Mixを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、IMPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 3 IMPプレートを280 × gで1分間遠心します。

IMPのインキュベーション

- 1 シールしたIMPプレートを、予熱しておいたマイクロヒーティングシステムにセットします。カバーを閉め、30°Cで30分間インキュベートします。
- 2 IMPプレートをマイクロヒーティングシステムから取り出し、次のステップの準備ができるまで氷上に置いておく。

IMPの精製

- 1 IMPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 3 十分に混和したAMPure XPビーズ160 μL を、100 μL のEnd Repair Mixが入っているIMPプレートの各ウェルに加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、IMPプレートを1,800 rpm で2分間攪拌します。
- 4 IMPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 5 IMPプレートをマグネットスタンドにセットして室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 6 IMPプレートから粘着シールをはがします。
- 7 127.5 μL にセットした200 μL シングルチャンネルピペットまたはマルチチャンネルピペットを使用し、IMPプレートの各ウェルから127.5 μL の上清を取り除き廃棄します。
- 8 ステップ7を1回繰り返す。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（9～11）は、IMPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 9 IMPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μL の用時調製80% EtOHを加えます。
- 10 IMPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 11 ステップ9および10を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 12 IMPプレートを室温で15分間乾燥させた後、マグネットスタンドから外します。
- 13 乾燥させた各ウェルのペレットを、17.5 μL のResuspension Bufferで再懸濁します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a IMPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、IMPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 14 IMPプレートを280 \times gで1分間遠心します。
- 15 IMPから粘着シールをはがします。
- 16 IMPプレートを室温で2分間インキュベートします。

- 17 IMPプレートをマグネットスタンドにセットして室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 18 IMPプレートの各ウェルから15 μ Lの上清を取り、ALPバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。



安全なストップポイント

ただちに60ページ、3'末端のアデニル化へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。


3'末端のアデニル化

平滑末端を持つフラグメントの3'末端に1塩基の「A」ヌクレオチドを付加し、アダプターライゲーション中にフラグメント同士がライゲーションすることを防ぎます。アダプターの3'末端に存在する1塩基の「T」ヌクレオチドが相補的なオーバーハングとなり、アダプターとフラグメントのライゲーションが起こります。この戦略を用いることにより、カメラ（連結されたテンプレート）の生成率を低く抑えられます。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
A-Tailing Mix (ATL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
[オプション] A-Tailing Control (CTA)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	1	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	3	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	3	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を用意します。
- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。室温で融解した後、氷上に置きます：
 - A-Tailing Control
 -  注記
A-Tailing Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置き換えることができます。
 - A-Tailing Mix
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。

- ▶ 58ページ、IMPの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、ALPプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解します。
 - 融解したALPプレートを280 × gで1分間遠心します。
 - ALPプレートから粘着シールをはがします。
- ▶ 2台のマイクロヒーティングシステムを予熱します：システム1を37°C、システム2を70°Cに設定。

ATLの添加

- 1 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 融解したA-Tailing Controlのチューブを600 × gで5秒間遠心します。
 - 使用前にA-Tailing ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（例：1 μL A-Tailing Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したA-Tailing Controlは廃棄します。
 - ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの希釈したA-Tailing Controlを加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合は、ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 2 ALPプレートの各ウェルに12.5 μLの融解したA-Tailing Mixを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します。
 - a ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、ALPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 3 ALPプレートを280 × gで1分間遠心します。

ALPのインキュベーション1

- 1 シールしたALPプレートを、予熱しておいたマイクロヒーティングシステム1にセットします。カバーを閉め、37°Cで30分間インキュベートします。
- 2 37°Cでのインキュベーション後ただちにマイクロヒーティングシステム1からALPプレートを取り出し、予熱しておいたマイクロヒーティングシステム2にセットします。カバーを閉め、70°Cで5分間インキュベートします。
- 3 アダプターのライゲーションへ備え、マイクロヒーティングシステム1を30°Cにセットしておきます。
- 4 速やかにALPプレートをマイクロヒーティングシステム2から取り出し、氷上に1分間置きます。
- 5 62ページ、アダプターのライゲーションへ進みます。


アダプターのライゲーション

本プロセスでは、ds cDNAの末端にインデックスアダプターを結合させ、フローセル表面にハイブリダイズ可能な状態にします。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
Ligation Mix (LIG)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
RNA Adapter Indexes (AR001-AR016, AR018- AR023, AR025, AR027)	使用する各インデッ クスを1列8反応につ き1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Stop Ligation Buffer (STL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
[オプション] Ligation Control (CTL)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
以下のバーコードラベル： • CAP (Clean Up ALP Plate) • PCR (Polymerase Chain Reaction)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルHSPプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XPビーズ	サンプルあたり92 μL	2°C~8°C	ユーザー
80%エタノール(EtOH)、 用時調製	サンプルあたり800 μL	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	7	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの試薬 リザーバー (マルチチャンネルピペット を使用する場合)	4~28	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連 ストリップチューブおよび キャップ (マルチチャンネルピペット を使用する場合)	4~28	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 以下の試薬を-25°C~-15°Cの保管場所から取り出し、室温で融解します：
 - Ligation Control
 -  注記
Ligation Controlの使用はオプションであり、等量のResuspension Bufferで置きかえることができます。
 - 使用するインデックスのRNA Adapter Indexチューブ
 - Stop Ligation Buffer
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ ベストプラクティスのHandling Magnetic Beadsを確認しておきます。イルミナのウェブサイトでTruSeq RNAサンプル調製v2のベストプラクティスにアクセスする方法については、8ページ、[追加リソース](#)を参照してください。
- ▶ AMPure XPビーズを保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ マイクロヒーティングシステムを30°Cに予熱しておきます。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにCAPバーコードラベルを貼ります。
- ▶ 新しい96ウェルHSPプレートにPCRバーコードラベルを貼ります。



注記

ライブラリーをインデックス化する際、後で同じプールに混ぜ合わせるサンプルは、横1列のウェルに並べておくことを推奨します。また、縦1列には同じインデックスを加えるようにします。このように配置しておく、後でインデックスアダプターを加える際およびインデックス化したライブラリーをプールする際にピペット操作が容易になります。

LIGの添加

- 1 融解したRNA Adapter Indexチューブ、Ligation Control（Ligation Controlを使用する場合）、およびStop Ligation Bufferチューブを600 × gで5秒間遠心します。
- 2 使用する直前にLigation Mixチューブを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
- 3 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 4 以下のいずれかを行います：
 - インラインコントロール試薬を使用する場合：
 - 使用前にLigation ControlをResuspension Bufferで100倍に希釈します（1 μL Ligation Control + 99 μL Resuspension Buffer）。使用后、希釈したLigation Controlは廃棄します。
 - ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの希釈したLigation Controlを加えます。
 - インラインコントロール試薬を使用しない場合は、ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのResuspension Bufferを加えます。
- 5 ALPプレートの各ウェルに2.5 μLのLigation Mixを加えます。
- 6 Ligation Mixのチューブは使用后速やかに-25°C~-15°Cの保管場所へ戻します。
- 7 ALPプレートの各ウェルに2.5 μLの融解したRNA Adapter Indexを加えます。
 - a ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、ALPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 8 ALPプレートを280 × gで1分間遠心します。

ALPのインキュベーション2

- 1 シールしたALPプレートを、予熱しておいたマイクロヒーティングシステムにセットします。カバーを閉め、30°Cで10分間インキュベートします。
- 2 ALPプレートをマイクロヒーティングシステムから取り出します。

STLの添加

- 1 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ALPプレートの各ウェルに5 μ LのStop Ligation Bufferを加え、ライゲーション反応を不活性化します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、ALPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 3 ALPプレートを280 \times gで1分間遠心します。

ALPの精製

- 1 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 2 AMPure XPビーズを少なくとも1分間、またはビーズが十分に拡散するまでボルテックスします。
- 3 ALPプレートの各ウェルに、混合したAMPure XPビーズを42 μ L加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、ALPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 4 ALPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 5 ALPプレートを280 \times gで1分間遠心します。
- 6 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 7 ALPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 8 ALPプレートの各ウェルから79.5 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（9～11）は、ALPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 9 ALPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。
- 10 ALPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 11 ステップ9および10を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 12 ALPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾します。

- 13 ALPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 14 ALPプレートの各ウェルに52.5 μ LのResuspension Bufferを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a ALPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、ALPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 15 ALPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 16 ALPプレートを280 \times gで1分間遠心します。
- 17 ALPプレートから粘着シールをはがします。
- 18 ALPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 19 ALPプレートの各ウェルから50 μ Lの上清を取り、CAPバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 20 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 21 CAPプレートの各ウェルに、混合したAMPure XPビーズを50 μ L加え、2回目の精製を行います。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CAPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CAPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 22 CAPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 23 CAPプレートを280 \times gで1分間遠心します。
- 24 CAPプレートから粘着シールをはがします。
- 25 CAPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 26 CAPプレートの各ウェルから95 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（27～29）は、CAPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 27 CAPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 28 CAPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。
- 29 ステップ27および28を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 30 CAPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾させます。
- 31 CAPプレートをマグネットスタンドから外します。
- 32 CAPプレートの各ウェルに22.5 μ LのResuspension Bufferを加えます。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CAPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CAPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。

- 33 CAPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 34 CAPプレートを280 × gで1分間遠心します。
- 35 CAPプレートから粘着シールをはがします。
- 36 CAPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 37 CAPプレートの各ウェルから20 μLの上清を取り、PCRバーコードでラベルした新しいHSPプレートの対応するウェルに移します。ビーズ塊を乱さないように注意してください。



安全なストップポイント

ただちに67ページ、DNAフラグメントの濃縮へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、PCRプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。

DNAフラグメントの濃縮

本プロセスでは、両端にアダプター分子を持つDNAフラグメントをPCRによって選択的に濃縮し、ライブラリー中のDNA量を増やします。PCRは、アダプター末端にアニールするPCRプライマーカクテルを用いて実施します。ライブラリー中でのPCRによる偏りを避けるため、PCRのサイクル数は最小限に抑えます。



注記

PCRにより、両端にアダプターが結合したフラグメントが濃縮されます。末端にアダプターが1つしかないまたは全くないフラグメントは、ライゲーションの効率が不十分なために生じる副生成物です。どちらのフラグメントもクラスター形成には使用できません。アダプターを全く持たないフラグメントは、フローセル表面のプライマーにハイブリダイズできません。片方の末端のみに1つのアダプターを持つフラグメントは、フローセル表面のプライマーにハイブリダイズ可能ですがクラスターを形成できません。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
PCR Master Mix (PMM)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
PCR Primer Cocktail (PPC)	48反応あたり1チューブ	-25°C~-15°C	イルミナ
Resuspension Buffer (RSB)	1チューブ	2°C~8°C	イルミナ
以下のバーコードラベル • CPP (Clean Up PCR Plate) • TSP1 (Target Sample Plate)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルHSPプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
AMPure XPビーズ	サンプルあたり50 µL	2°C~8°C	ユーザー
80% エタノール (EtOH)、用時調製	サンプルあたり400 µL	15°C~30°C	ユーザー
アイスバケット	必要に応じて	-25°C~-15°C	ユーザー
Microseal 「A」 フィルム	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	3	15°C~30°C	ユーザー
RNase/DNaseフリーの8連ストリップチューブおよびキャップ (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー

アイテム	数量	保管条件	供給元
RNase/DNaseフリーの試薬リザーバー (マルチチャンネルピペットを使用する場合)	5	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 氷を入れた容器を用意します。
- ▶ PCR Master MixおよびPCRプライマーカクテルを、-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。室温で融解した後、氷上に置きます。
- ▶ 融解したPCR Master MixおよびPCRプライマーカクテルのチューブを600×gで5秒間遠心します。
- ▶ Resuspension Bufferを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、室温に戻します。
- ▶ AMPure XP ビーズを2°C~8°Cの保管場所から取り出し、少なくとも30分置いて室温に戻します。
- ▶ 64ページ、ALPの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、PCRプレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解します。
 - 融解したPCRプレートを280×gで1分間遠心します。
 - 融解したPCRプレートから粘着シールをはがします。
- ▶ サーマルサイクラーに以下のプログラムを予め設定しPCRとして保存します：
 - ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - 98°C 30秒間
 - 以下を15サイクル：
 - 98°C 10秒間
 - 60°C 30秒間
 - 72°C 30秒間
 - 72°C 5分間
 - 10°C ホールド
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにCPPバーコードラベルを貼ります。
- ▶ 新しい96ウェルHSPプレートにTSP1バーコードラベルを貼ります。

PCRの調製

- 1 PCRプレートの各ウェルに5 μLの融解したPCRプライマーカクテルを加えます。
- 2 PCRプレートの各ウェルに25 μLの融解したPCR Master Mixを加えます。
 - a PCRプレートをMicroseal「A」フィルムで密封します。



警告

Microseal「A」シーリングフィルムを貼る際には、メーカーの取り扱い説明書に従ってください。不適切な使い方をすると、不十分なシーリング（サンプルの蒸発またはクロスコンタミネーション）または過剰なシーリング（シール全体をはがした後に一部のシールがウェルに残る）につながります。

- b マイクロプレートシェーカーを使用し、PCRプレートを1,600 rpmで20秒間攪拌します。
- 3 PCRプレートを280×gで1分間遠心します。

PCR増幅

- 1 シールしたPCRプレートを予めプログラムしておいたサーマルサイクラーにセットします。カバーを閉め、PCRを選択してランを開始し、増幅を行います。
 - a ヒートリッドオプションを選び、100°Cに設定
 - b 98°C 30秒間
 - c 以下を15サイクル：
 - 98°C 10秒間
 - 60°C 30秒間
 - 72°C 30秒間
 - d 72°C 5分間
 - e 10°C ホールド

PCRの精製

- 1 PCRプレートから粘着シールをはがします。
- 2 ビーズが十分に拡散するまでAMPure XPビーズをボルテックスします。
- 3 50 μ Lの混合したAMPure XPビーズを、CPPバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの各ウェルに加えます。
- 4 PCRプレートの各ウェルから溶液の全量を取り、50 μ LのAMPure XPビーズが入ったCPPプレートの対応するウェルに移します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CPPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CPPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 5 CPPプレートを室温で15分間インキュベートします。
- 6 CPPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 7 CPPプレートから粘着シールをはがします。
- 8 CPPプレートの各ウェルから95 μ Lの上清を取り除き、廃棄します。



注記

以下の80% EtOHによる洗浄ステップ（9~11）は、CPPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま行います。

- 9 CPPプレートをマグネットスタンドにセットした状態で、ビーズ塊を乱さないようにしながら各ウェルに200 μ Lの用時調製80% EtOHを加えます。
- 10 CPPプレートを室温で30秒間インキュベートし、各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄します。
- 11 ステップ9および10を1回繰り返し、合計2回の80% EtOHによる洗浄を行います。
- 12 CPPプレートをマグネットスタンドにセットしたまま、室温で15分間サンプルを風乾させます。

- 13 乾燥させた各ウェルのペレットを32.5 μ LのResuspension Bufferで再懸濁します。以下の手順で溶液を完全に混和します：
 - a CPPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、CPPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 14 CPPプレートを室温で2分間インキュベートします。
- 15 CPPプレートをマグネットスタンドにセットし、室温で5分間、または溶液が透明になるまで置きます。
- 16 CPPプレートから粘着シールをはがします。
- 17 CPPプレートの各ウェルから30 μ Lの上清を取り、TSP1バーコードでラベルした新しいHSPプレートの対応するウェルに移します。



安全なストップポイント

ただちに71ページ、ライブラリーの検証へ進まない場合、ここでプロトコールを安全にストップすることができます。ストップする場合は、TSP1プレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、-25°C~-15°Cで保管します（最長7日間まで）。

ライブラリーの検証

イルミナでは、以下の手順に従って作製したサンプルライブラリーのクオリティ制御解析、およびDNAライブラリーテンプレートの定量を実施することを推奨しています。

ライブラリーの定量

イルミナのシーケンスプラットフォームで最高品質のデータを得るためには、フローセルの全レーンにわたり最適なクラスター密度を実現することが重要です。クラスター密度を最適化するにはDNAライブラリーテンプレートの正確な定量が欠かせません。『*Illumina Sequencing Library qPCR Quantification Guide*』（パーツ番号：11322363）に従い、qPCRによるライブラリーの定量を行ってください。



注記

イルミナのウェブサイトから『*Illumina Sequencing Library qPCR Quantification Guide*』（パーツ番号：11322363）をダウンロードする方法については、8ページ、追加リソースを参照してください。

クオリティ制御

- 1 以下のいずれかを行います：
 - 1 μ Lの再懸濁したライブラリーをアジレント・テクノロジー社の2100 バイオアナライザで泳動します。Agilent DNA 1000など、DNA用のラボチップを使用します。
 - 再懸濁したライブラリー1 μ LにRSBを1 μ L加えて希釈し、Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kitを使用してAdvanced Analytical Fragment Analyzerで泳動します。
- 2 サンプルのサイズと純度を確認します。最終的な産物は260 bp付近（シングルリード用ライブラリーの場合）にバンドとして存在するはずですが。

図8 TruSeq RNAサンプル調製v2におけるライブラリーのサイズ分布例

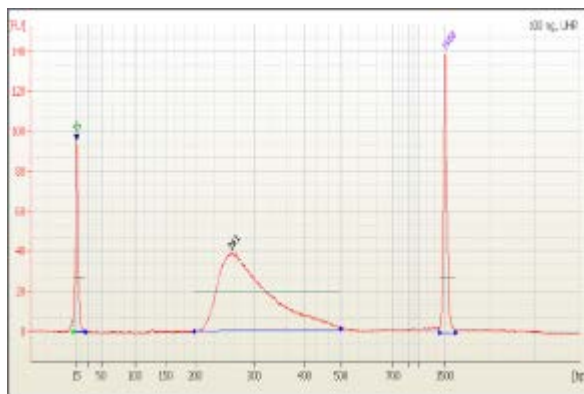
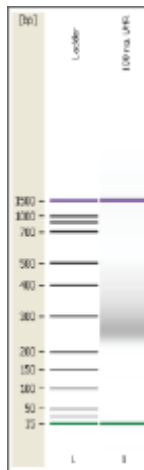


図9 TruSeq RNAサンプル調製v2における260 bpのPCR産物



ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリング

本プロセスは、クラスター形成のためのDNAテンプレートを調製する方法について述べています。インデックス化したDNAライブラリーをDCTプレート中で10 nMにノーマライズした後、PDPプレート中で等量ずつプールします。インデックスを付加していないDNAライブラリーの場合は、DCTプレート中で10 nMにノーマライズします。

試薬および消耗品

アイテム	数量	保管条件	供給元
以下のバーコードラベル： • DCT (Diluted Cluster Template) • PDP (Pooled DCT Plate) (プーリングを行う場合のみ)	プレートあたり1枚	15°C~30°C	イルミナ
96ウェルHSPプレート (プーリングを行う場合のみ)	1	15°C~30°C	ユーザー
96ウェルMIDIプレート	1	15°C~30°C	ユーザー
Microseal 「B」 粘着シール	4	15°C~30°C	ユーザー
Tris-HCl 10 mM、pH8.5、0.1% Tween 20	各ライブラリーの濃度 10 nMにノーマライズ するのに充分な量	15°C~30°C	ユーザー

事前準備

- ▶ 69ページ、PCRの精製を行った後にプレートを保存していた場合は、TSP1プレートを-25°C~-15°Cの保管場所から取り出します。
 - 室温で融解させます。
 - 融解したTSP1プレートを280 × gで1分間遠心します。
 - TSP1プレートから粘着シールをはがしてください。
- ▶ 『TruSeq Sample Preparation Pooling Guide』（パーツ番号：15042173）を読んでください。イルミナのウェブサイトから当ガイドをダウンロードする方法について、参照してください。
- ▶ 新しい96ウェルMIDIプレートにDCTバーコードラベルを貼ってください。
- ▶ [プーリングを行う場合のみ] 新しい96ウェルHSPプレートにPDPバーコードラベルを貼ってください。

DCTの調製

- 1 TSP1プレートの各ウェルから10 μLのサンプルライブラリーを取り、DCTバーコードでラベルした新しいMIDIプレートの対応するウェルに移します。
- 2 Tris-HCl 10 mM、pH 8.5、0.1% Tween 20を用い、DCTプレートの各ウェルに入っているサンプルライブラリーの濃度を10 nMにノーマライズします。



注記

各サンプルライブラリー収量の定量結果により、DCTプレートの最終溶液量は10～400 μL になります。

- 3 以下の手順でDCTプレートを混和します：
 - a DCTプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、DCTプレートを1,000 rpmで2分間攪拌します。
- 4 DCTプレートを280 \times gで1分間遠心します。
- 5 DCTプレートから粘着シールをはがします。
- 6 作製するライブラリーのタイプにより、以下のいずれかを行います：
 - ライブラリーのプーリングを行わない場合、プロトコールはここで終了です。以下のいずれかを行います：
 - クラスターの形成に進みます。詳細については、使用するイルミナプラットフォームのユーザーガイドにおいてクラスター形成に関するセクションを参照してください。
 - DCTプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、 -25°C ～ -15°C で保管します。
 - ライブラリーをプーリングする場合、PDPの調製（プーリングを行う場合のみ）へ進みます。

PDPの調製（プーリングを行う場合のみ）



注記

サンプルのプーリングを行わない場合、PDPプレートの調製は行いません。

- 1 各プールで混ぜ合わせるサンプルの数を決めます。
- 2 プールする予定のノーマライズ済みサンプルライブラリーについて、各10 μL ずつをDCTプレートから取り、PDPバーコードでラベルした新しいHSPプレートの1ウェルに移します。

PDPプレートの各ウェルにおける溶液量は、混ぜ合わせたサンプルライブラリー数の10倍であり、20～240 μL （2～24ライブラリー）となります。例えば、2サンプルの場合の溶液量は20 μL であり、12サンプルでは120 μL 、24サンプルでは240 μL となります。



注記

同じインデックスを持つサンプル同士をプーリングしないようにしてください。

- 3 以下の手順でPDPプレートを混和します：
 - a PDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封します。
 - b マイクロプレートシェーカーを使用し、PDPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌します。
- 4 以下のいずれかを行います：
 - クラスターの形成へ進みます。詳細については、使用するイルミナプラットフォームのユーザーガイドにおいてクラスター形成に関するセクションを参照してください。
 - PDPプレートをMicroseal「B」粘着シールで密封し、 -25°C ～ -15°C で保管します。

補足情報

はじめに	76
略語一覧	77
キットの内容	79
消耗品および機器	84
TruSeq RNA Sample Prep Kit v2インデックスアダプターの配列	87



はじめに

本ガイドに記述するプロトコールは、ユーザーがこの付録の内容を確認し、キットの内容を確認しており、必要な消耗品および機器がすべて揃っていることを前提としています。

略語一覽

表3 略語一覽

略語	定義
ALP	Adapter Ligation Plate
ATL	A-Tailing Mix
BBB	Bead Binding Buffer
BWB	Bead Washing Buffer
CAP	Clean Up ALP Plate
CCP	cDNA Clean Up Plate
cDNA	Complimentary DNA
CDP	cDNA Plate
CPP	Clean Up PCR Plate
CTA	A-Tailing Control
CTE	End Repair Control
CTL	Ligation Control
DCT	Diluted Cluster Template
dsDNA	double-stranded DNA
ELB	Elution Buffer
EPF	Elute, Prime, Fragment Mix
ERP	End Repair Mix
EUC	Experienced User Card
FSM	First Strand Master Mix
HSP	Hardshell Plate
HS	High Sample
HT	High Throughput
IMP	Insert Modification Plate
IEM	Illumina Experiment Manager

略語	定義
LIG	Ligation Mix
LS	Low Sample
LTF	Lab Tracking Form
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDP	Pooled Dilution Plate
PMM	PCR Master Mix
PPC	PCR Primer Cocktail
RBP	RNA Bead Plate
RFP	RNA Fragmentation Plate
RPB	RNA Purification Beads
RSB	Resuspension Buffer
SAV	SequenceAnalysisViewer
SSM	Second Strand Master Mix
STL	Stop Ligation Buffer
TSP	Target Sample Plate

キットの内容

TruSeq RNA Sample Preparation v2のプロトコールを始める前に、本セクションで示す試薬がすべて揃っていることを確認します。

TruSeq RNA Sample Prep Kit v2は、Set AとSet Bがあります。各TruSeq RNA Sample Prep Kit v2には48サンプルを調製するのに十分な量の試薬が含まれています。Set AとSet Bを併用する場合、各キットに含まれる12種類のインデックスを使用し、最大で24サンプルまでをプールできます。

表4 TruSeq RNA Sample Prep v2 Kit

キット名	カタログ番号	対応サンプル数	インデックス数
TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 - Set A (48rxn)	RS-121-2001	48	12
TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 - Set B (48rxn)	RS-121-2002	48	12

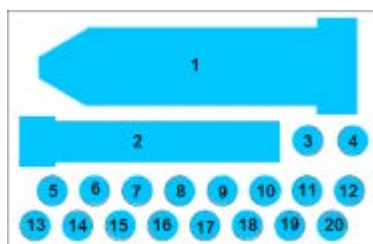
48 Samples, ボックスAおよびB

ご注文のセットにより、ボックスAまたはボックスBが納品されます。これらのボックスにはプレート用のバーコードラベルも入っています。

-25°C~-15°Cで保管

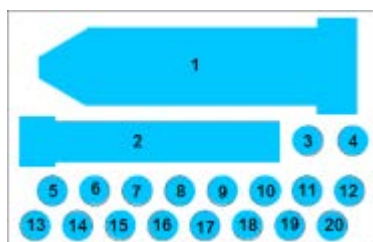
このボックスはドライアイス詰めでお届けされます。キット到着後ただちに以下のコンポーネントを-25°C~-15°Cで保管してください。

図10 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2、ボックスA、パーツ番号：15025062



スロット	試薬	パーツ番号	内容
1	RSB	15026770	Resuspension Buffer
2	ERP	15012494	End Repair Mix
3	ATL	15012495	A-Tailing Mix
4	LIG	15026773	Ligation Mix
5	CTE	15026774	End Repair Control
6	CTA	15026775	A-Tailing Control
7	CTL	15026776	Ligation Control
8	STL	15012546	Stop Ligation Buffer
9	AR002	15026634	RNA Adapter Index 2
10	AR004	15026636	RNA Adapter Index 4
11	AR005	15026637	RNA Adapter Index 5
12	AR006	15026638	RNA Adapter Index 6
13	AR007	15026640	RNA Adapter Index 7
14	AR012	15026645	RNA Adapter Index 12
15	AR013	15024655	RNA Adapter Index 13
16	AR014	15024656	RNA Adapter Index 14
17	AR015	15024657	RNA Adapter Index 15
18	AR016	15024658	RNA Adapter Index 16
19	AR018	15024660	RNA Adapter Index 18
20	AR019	15024661	RNA Adapter Index 19

図11 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2、ボックスB、パーツ番号：15025063



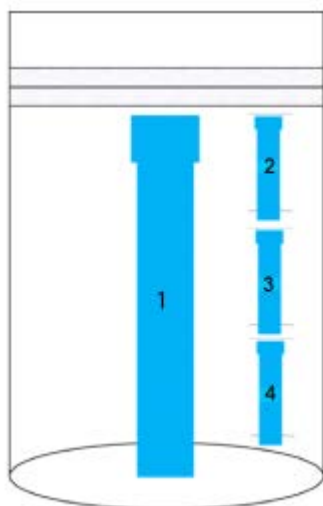
スロット	試薬	パーツ番号	内容
1	RSB	15026770	Resuspension Buffer
2	ERP	15012494	End Repair Mix
3	ATL	15012495	A-Tailing Mix
4	LIG	15026773	Ligation Mix
5	CTE	15026774	End Repair Control
6	CTA	15026775	A-Tailing Control
7	CTL	15026776	Ligation Control
8	STL	15012546	Stop Ligation Buffer
9	AR001	15026633	RNA Adapter Index 1
10	AR003	15026635	RNA Adapter Index 3
11	AR008	15026641	RNA Adapter Index 8
12	AR009	15026642	RNA Adapter Index 9
13	AR010	15026643	RNA Adapter Index 10
14	AR011	15026644	RNA Adapter Index 11
15	AR020	15024662	RNA Adapter Index 20
16	AR021	15024663	RNA Adapter Index 21
17	AR022	15024664	RNA Adapter Index 22
18	AR023	15024665	RNA Adapter Index 23
19	AR025	15024667	RNA Adapter Index 25
20	AR027	15024668	RNA Adapter Index 27

48 Samples - ボックス1 of 2

指定された条件で保管

このボックスは冷却ジェルパックと共に出荷されます。キット到着後ただちに各コンポーネントを指定の条件で保管してください。

図12 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 48 Samples、(ボックス1 of 2)、パーツ番号 : 15027078



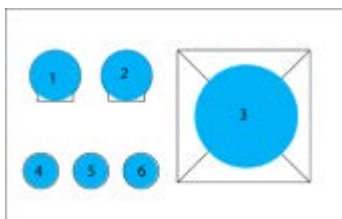
スロット	試薬	パーツ番号	内容	保管温度
1	RPB	15026778	RNA Purification Beads	2°C~8°C
2	DTE	15026766	CTE Dilution Tube	室温
3	DTA	15026805	CTA Dilution Tube	室温
4	DTL	15026807	CTL Dilution Tube	室温

48 Samples - ボックス2 of 2

-25°C~-15°Cで保管

このボックスはドライアイス詰めでお届けされます。キット到着後ただちに以下のコンポーネントを-25°C~-15°Cで保管してください。

図13 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 ボックス2、パーツ番号 : 15027387



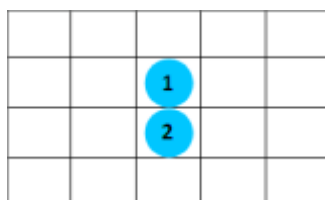
スロット	試薬	パーツ番号	内容
1	BBB	15026779	Bead Binding Buffer
2	ELB	15026780	Elution Buffer
3	BWB	15012925	Bead Washing Buffer
4	EPF	15026782	Elute, Prime, Fragment Mix
5	FSM	15026783	First Strand Master Mix
6	SSM	15026784	Second Strand Master Mix

48 Samples - PCRボックス

-25°C~-15°Cで保管

このボックスはドライアイス詰めでお届けされます。キット到着後ただちに以下のコンポーネントを-25°C~-15°Cで保管してください。

図14 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2、48 Samples-PCRボックス、パーツ番号：15027084



スロット	試薬	パーツ番号	内容
1	PMM	15026785	PCR Master Mix
2	PPC	15026786	PCR Primer Cocktail

消耗品および機器

TruSeq RNAサンプル調製v2プロトコルを開始する前に、ユーザーが用意する消耗品および機器がすべて揃っていることを確認してください。一部の消耗品および機器は特定のプロトコル（LSまたはHS）でのみ必要なものですが、これらについては別表に示します。



注記

TruSeq RNAサンプル調製v2プロトコルは、ここに示す消耗品および機器を使用して最適化および検証を行っています。代替の消耗品または機器を使用した場合、同等の性能は保証されません。

表5 ユーザーが用意する消耗品

消耗品	供給元
1.5 mL RNase/DNase-free non-sticky tubes	Life Technologies、製品番号：AM12450
10 μ L フィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品供給元
10 μ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
10 μ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
1000 μ L フィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品供給元
1000 μ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
1000 μ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
200 μ L フィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品供給元
200 μ L マルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
200 μ L シングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品供給元
96ウェル保存用プレート、ラウンドウェル、0.8 mL（「MIDI」プレート）	Fisher Scientific、製品番号：AB-0859
96ウェル 2 mL ディープウェルプレート（オプション—試薬分注用）	Thomson Instrument Company、製品番号：951652
Agencourt AMPure XP 60 mL kit	Beckman Coulter Genomics、製品番号：A63881
Certified Low Range Ultra アガロース（オプション—インプットRNAの品質確認用）	Bio-Rad、製品番号：161-3107
100%エタノール（無水エタノール）分子生物学用（500 mL）	Sigma-Aldrich、製品番号：E7023
Microseal「B」粘着シール	Bio-Rad、製品番号：MSB-1001

消耗品	供給元
MicroTube (6x16 mm)、AFA fiber with crimp-cap (オプション—代替の断片化法用)	Covaris、パーツ番号：520052
MinElute Gel Extraction Kit (オプション—すでに単離されたmRNAからスタートする場合)	QIAGEN、パーツ番号：28604
ヌクレアーゼフリー超純水	一般的なラボ用品供給元
RNaseZap (実験器具表面のコンタミネーション要因除去用)	一般的なラボ用品供給元
RNase/DNaseフリー 8連ストリップチューブおよびキャップ	一般的なラボ用品供給元
RNase/DNaseフリー マルチチャンネルピペット用試薬リザーバー	VWR、製品番号：89094-658
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen、製品番号：18064-014
Tris-HCl 10 mM, pH8.5	一般的なラボ用品供給元
Tween 20	Sigma、製品番号：P7949

表6 ユーザーが用意する消耗品—LSプロトコル用に追加で必要なもの

消耗品	供給元
96ウェル0.3 mL PCRプレート	一般的なラボ用品供給元

表7 ユーザーが用意する消耗品—HSプロトコル用に追加で必要なもの

消耗品	供給元
Hard-Shell 96 ウェルスカート付きPCRプレート (「HSP」プレート)	Bio-Rad、製品番号：HSP-9601
Microseal 「A」 フィルム	Bio-Rad、製品番号：MSA-5001

表8 ユーザーが用意する機器

機器	供給元
96ウェルサーマルサイクラー (ヒートリッド機能付き)	一般的なラボ用品供給元
2100 バイオアナライザ Desktop System	Agilent、製品番号 : G2940CA
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent、製品番号 : 5067-1504
Magnetic stand-96	Life Technologies、製品番号 : AM10027
マイクロプレート用遠心機	一般的なラボ用品供給元
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品供給元

表9 ユーザーが用意する機器—HSプロトコール用に追加で必要なもの

機器	供給元
高速マイクロプレートシェーカー	VWR、カタログ番号 : <ul style="list-style-type: none"> • 13500-890 (110 V/120 V)または • 14216-214 (230 V)
MIDIプレートインサート (ヒーティングシステム用) 注記 : 連続的な加熱ステップに対応するため、2枚用意しておくことを推奨します。	イルミナ、カタログ番号 : BD-60-601
ストロボスコープ	一般的なラボ用品供給元
以下のいずれかのヒーティングシステム : 注記 : 連続的な加熱ステップに対応するため、2台用意しておくことを推奨します。 <ul style="list-style-type: none"> • SciGene TruTemp Heating System • Hybex Microsample Incubator 	<ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号 : <ul style="list-style-type: none"> • SC-60-503 (115 V)または • SC-60-504 (220 V) • SciGene、カタログ番号 : <ul style="list-style-type: none"> • 1057-30-0 (115 V)または • 1057-30-2 (230 V)

TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 インデックスアダプターの配列

TruSeq RNA Sample Prep Kit v2に含まれるインデックスアダプターの配列を以下に示します。Alternate AssayまたはChIPキットに含まれるインデックスアダプター配列を以下に示します。



注記

- インデックスの番号は連番ではありません。Index 17、24、26は存在しません。
- 丸括弧 () 内の塩基は7サイクル目に読まれる塩基であり、インデックス配列の一部とはみなされません。サンプルシートではインデックス配列は6塩基と記録してください。番号が13以降のインデックスでは、7塩基目（丸括弧内）がAとは限らず、この塩基はインデックスリードの7サイクル目に現れます。
- インデックスリードのシーケンスに用いるサイクル数に関する詳細は、ご使用になるシーケンサーのユーザーガイドを参照してください。

表10 DNAキット用Alternate Assay Set Aインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AD002	CGATGT(A)	AD013	AGTCAA(C)
AD004	TGACCA(A)	AD014	AGTTCC(G)
AD005	ACAGTG(A)	AD015	ATGTCA(G)
AD006	GCCAAT(A)	AD016	CCGTCC(C)
AD007	CAGATC(A)	AD018	GTCCGC(A)
AD012	CTTGTA(A)	AD019	GTGAAA(C)

表11 DNAキット用Alternate Assay Set Bインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AD001	ATCACG(A)	AD020	GTGGCC(T)
AD003	TTAGGC(A)	AD021	GTTTCG(G)
AD008	ACTTGA(A)	AD022	CGTACG(T)
AD009	GATCAG(A)	AD023	GAGTGG(A)
AD010	TAGCTT(A)	AD025	ACTGAT(A)
AD011	GGCTAC(A)	AD027	ATTCTT(T)

表12 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Set Aインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AR002	CGATGT(A)	AR013	AGTCAA(C)
AR004	TGACCA(A)	AR014	AGTTCC(G)
AR005	ACAGTG(A)	AR015	ATGTCA(G)
AR006	GCCAAT(A)	AR016	CCGTCC(C)
AR007	CAGATC(A)	AR018	GTCCGC(A)
AR012	CTTGTA(A)	AR019	GTGAAA(C)

表13 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 Set Bインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AR001	ATCACG(A)	AR020	GTGGCC(T)
AR003	TTAGGC(A)	AR021	GTTTCG(G)
AR008	ACTTGA(A)	AR022	CGTACG(T)
AR009	GATCAG(A)	AR023	GAGTGG(A)
AR010	TAGCTT(A)	AR025	ACTGAT(A)
AR011	GGCTAC(A)	AR027	ATTCCT(T)

表14 RNA LTおよびChIPキット用Product Line Set Aインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AR002	CGATGT(A)	AR013	AGTCAA(C)
AR004	TGACCA(A)	AR014	AGTTCC(G)
AR005	ACAGTG(A)	AR015	ATGTCA(G)
AR006	GCCAAT(A)	AR016	CCGTCC(C)
AR007	CAGATC(A)	AR018	GTCCGC(A)
AR012	CTTGTA(A)	AR019	GTGAAA(C)

表15 RNA LTおよびChIPキット用Product Line Set Bインデックスアダプターの配列

アダプター	配列	アダプター	配列
AR001	ATCACG(A)	AR020	GTGGCC(T)
AR003	TTAGGC(A)	AR021	GTTTCG(G)
AR008	ACTTGA(A)	AR022	CGTACG(T)
AR009	GATCAG(A)	AR023	GAGTGG(A)
AR010	TAGCTT(A)	AR025	ACTGAT(A)
AR011	GGCTAC(A)	AR027	ATTCCT(T)

代替の断片化プロトコール

はじめに	92
RNA断片化処理時間の調節	93
ds cDNA合成後のサンプル断片化	95



はじめに

最適なライブラリー調製、クラスター形成、およびシーケンスを行うためには、核酸を断片化する必要があります。トランスクリプトーム解析用のTruSeq RNAサンプル調製v2断片化プロトコールでは、mRNA精製後のRNAを高温処理して断片化を行います。断片化を行うことにより、インサートサイズの範囲が120 bp~200 bp、中央値が150 bpのライブラリーが得られます。TruSeq RNAサンプル調製v2の断片化プロトコールにより、効率的にライブラリーを調製し、トランスクリプトームにおいて最高のカバレッジを実現します。

ユーザーによっては、シーケンス実験における目的が異なる場合もあります。スプライスバリエーション解析などのアプリでは、最大のカバレッジを得るよりも、より長いインサートをシーケンスする必要性の方が高くなります。ライブラリーのインサートサイズを変更するには、2種類のオプションがあります：

- ▶ 断片化処理時間の調節
- ▶ ds cDNA合成後のサンプル剪断

RNA断片化処理時間の調節

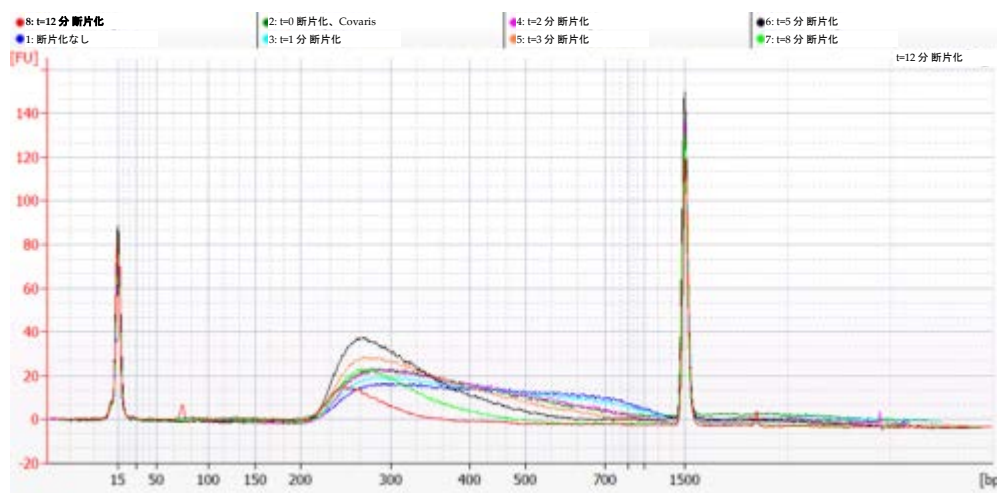
RNA断片化時間を調節してより長いRNAフラグメントを得るために、mRNAの精製および断片化ステップ中で、断片化処理時間を短縮することができます。そのためには、サーマルサイクラーのプログラム [Elution 2 - Frag - Prime : 94°C X分間、4°C ホールド] を変更します。求めるRNAフラグメントの長さによりXを決定してください。表16に参考処理時間とフラグメントサイズを示します。

表16 ライブラリーインサート断片化処理時間

94 °Cでの処理時間 (分)	インサート長の レンジ ^a (bp)	インサート長の 中央値 ^a (bp)	最終的なライブラリーサイ ズの平均値 (パイオアナラ イザによる解析、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

- インサート長は、クラスター形成およびペアエンドシーケンス後に決定したものです。
- 断片化処理時間が0分のサンプルについては、RFPのインキュベーション（断片化）ステップを省略します。代わりに、シールしたプレートを予熱しておいたサーマルサイクラーにセットしてください。カバーを閉め80°Cで2分間プレートをインキュベートし、プライミングされたmRNAをRNA Purification Beadsから溶出します。続いて、ただちにプレートをマグネットスタンドにセットし、第1鎖cDNAの合成へ進んでください。
- Covarisで剪断したサンプルは94°Cの代わりに80°Cで2分間インキュベーションしました。95ページ、cDNA合成後のサンプル断片化をご覧ください。

図15 断片化処理時間を短縮した結果



注記

アジレントバイオアナライザで測定したインサートサイズと、クラスター形成およびペアエンドシーケンス後に決定したインサートサイズの間にはずれが見られますが、これは短いフラグメントの方がクラスターを形成しやすいというバイアスによるものです。特定サイズのフラグメントをターゲットとする場合、アダプターのライゲーション後にゲルによるサイズセレクションが必要になります。

ds cDNA合成後のサンプル断片化

ds cDNAを合成した後にサンプルの剪断を行う場合は、mRNAの精製および断片化ステップで、サーマルサイクラーのプログラムElution 2 - Frag - Primeを [80°C 2分間、4°C ホールド] に変更します。mRNAの精製および断片化ステップで、RNAを断片化せずにmRNAを溶出してランダムプライマーをアニールさせます。プロトコールに従ってCDPの精製ステップへ進み、ds cDNAを精製します。ds cDNAは50 µLのResuspension Buffer中に存在します。cDNAをCovaris用のチューブに移し、以下の手順に従ってCovarisの装置を用い剪断することが出来ます。

ユーザーが用意する消耗品

- ▶ Covaris用チューブ
- ▶ ds cDNA

事前準備

- ▶ Covarisを使用する少なくとも30分前に装置の電源を入れてください。
- ▶ Covarisの取扱説明書に従い、水の脱気および冷却を行い、水温を3°C~6°Cにします。水温が6°Cになってから断片化を開始します。
- ▶ 新しい96ウェルプレートにIMPバーコードラベルを貼ってください。

手順

- 1 Covaris用チューブに50 µLのcDNAサンプルを入れ、各ds cDNAサンプルを剪断します。
- 2 以下の設定でds cDNAの断片化を行います：

オプション	設定
Duty cycle	5%
Intensity	3
Bursts per second	200
Duration	80秒
Mode	Frequency sweeping
Power	33~34W
温度	5.5°C~6°C

- 3 Covaris用チューブをシールし、600 × gで5秒間遠心します。
- 4 Covaris用チューブ内の溶液をIMPプレートに移します。
- 5 以下のいずれかを行います：
 - LSプロトコールの場合、25ページ、エンドリペアへ進みます。
 - HSプロトコールの場合、25ページ、エンドリペアへ進みます。

索引

A

ALP, 25, 56
ALPのインキュベーション1, 29, 61
ALPのインキュベーション2, 32, 64
ALPの精製, 32, 64
AMPure XPビーズ, 22, 25, 30, 34, 53,
56, 62, 67
ATL, 28, 60
ATLの添加, 29, 61

B

BaseSpace, 9, 44
BBB, 16, 46
BWB, 16, 46

C

CAP, 30, 62
CCP, 53
cDNA合成, 15, 45
CDP (cDNA Plate), 20, 51
CDPのインキュベーション1, 52
CDPのインキュベーション1, 21
CDPのインキュベーション2, 23, 54
CDPの精製, 23, 54
CDPの調製, 52
CDPの調製, 21
Covaris用チューブ, 95
CPP, 67
CTA, 28, 60
CTE, 25, 56
CTL, 30, 62

D

DCT, 39, 73
DCTの調製, 40, 73
ds cDNA, 95

E

ELB, 16, 46
Elution 2 - Frag - Prime, 19, 50, 93
EPF, 16, 46
ERP, 25, 56
experienced user card (EUC), 8

F

FSM, 20, 51

H

help, technical, 97
High Sample (HS), 3
HSP, 3

I

IEM, 9
IMP, 22, 26, 53, 57
IMPのインキュベーション, 26, 58
IMPの精製, 27
IMPの精製, 58
IMPの調製, 26, 57
in-line control DNA, 6

L

LIG, 30, 62
LIGの添加, 31, 63
Low Sample, 3

M

MIDI, 3
mRNA, 2
mRNA Denaturation, 17, 48

P

PCR, 30, 62
PCRの精製, 36, 69
PCRの調製, 35, 68
PCR増幅, 35, 69
PDP, 39, 73
PDPの調製, 40, 74
PMM, 34, 67
PPC, 34, 67

Q

qPCR, 9

R

RBP, 16, 46
RBPのインキュベーション1, 17, 48
RBPのインキュベーション2, 18, 49
RBPの洗浄, 17, 48
RBPの調製, 17, 47
RFP, 46
RFPの調製, 18, 49
RNA Adapter Indexes, 30, 62
RPB, 16, 46
RSB, 16, 22, 25, 28, 30, 34, 46, 53, 56,
60, 62, 67

S

SAV, 6, 7
SSM, 22, 53
SSMの添加, 23, 54
STL, 30, 62
STLの添加, 32, 64
SuperScript II, 20, 51

T

Tris-HCl, 39, 73
TSP1, 34, 39, 67, 73

い

インデックスアダプター, 2, 87

え

エンドリペア, 2

か

カスタマーサポート, 97

く

クオリティ制御, 37, 71
クラスター形成, 40

こ

合成した後にサンプルの剪断を行う,
95

さ

サーマルサイクラー, 3

し

試薬リザーバー, 16, 20, 22, 25, 28, 30,
34, 46, 51, 53, 56, 60, 62, 68, 85

す

ストリップチューブおよびキャップ,
16, 20, 22, 25, 28, 30, 34, 46, 51, 53,
56, 60, 62, 67

た

第1鎖cDNA, 2
第2鎖cDNA, 2
断片化処理時間, 92

て

テクニカルサポート, 97

と

ドキュメント, 97
トレーニング, 8

ふ

プーリングしたサンプルの量, 40, 74
プーリングの手引き, 9
フラグメント, 2

へ

ベストプラクティス, 8

ほ

ポリA, 2, 15, 45
ポリT磁気ビーズ, 2, 15, 45

ま

マイクロヒーティングシステム, 3
マイクロプレートシェーカー, 3

ら

ライブラリーの定量, 37, 71

わ

ワークフローの略図, 13, 43

テクニカルサポート

技術的なサポートに関しては、イルミナのテクニカルサポートにご連絡ください。

表17 イルミナ一般問い合わせ先

イルミナのウェブサイト	jp.illumina.com
電子メール	techsupport@illumina.com

表18 イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	連絡先電話番号	地域	連絡先電話番号
日本	0800.111.5011	スペイン	900.812168
北米	1.800.809.4566	デンマーク	80882346
アイルランド	1.800.812949	ドイツ	0800.180.8994
イタリア	800.874909	ニュージーランド	0800.451.650
英国	0800.917.0041	ノルウェー	800.16836
オーストリア	800.296575	フィンランド	800.918363
オランダ	800.0223859	フランス	800.91185
スイス	800.563118	ベルギー	800.81102
スウェーデン	20790181		

製品安全データシート

製品安全データシート（SDS）はイルミナのウェブサイト www.illumina.com/msds から入手できます。

製品ドキュメント

製品ドキュメントのPDFファイルはイルミナのウェブサイトからダウンロードできます。
www.illumina.com/support にアクセスして製品を選び、[Documentation & Literature] をクリックしてください。

