

製品コード 5500

研究用

Takara

**CycleavePCR™ Library Quantification
Kit (for Illumina)**

説明書

v201811Da

イルミナ社の次世代シーケンサー (MiSeq、Genome Analyzer //x、HiScanSQ、HiSeq 1000、HiSeq 2000) は、一度に多量の DNA 分子の塩基配列を超並列に決定します。通常、解析に必要なライブラリーは DNA 断片の両端に指定のアダプターを連結することにより調製されます。フローセル上において、調製したライブラリーを鋳型として、アダプターを認識するプライマーを用いたブリッジ PCR を行うことにより、1 分子由来の DNA クラスターを形成させ、このクラスターに蛍光塩基を取り込ませることにより塩基配列が決定されます。期待した収量と品質の高い配列データを得るためには、適切な数のライブラリー DNA 分子をフローセルにインストールし、最適な密度のクラスターを形成させることが重要です。シーケンサーにインストールするライブラリー DNA 分子が少ない場合には、クラスター密度が下がり期待した収量が得られず、一方でライブラリー DNA 分子が多すぎるとクラスター密度が増加し、データの品質低下を引き起こすことが懸念されます。そのため、ライブラリー DNA 分子の定量はシーケンスを成功させるために重要な工程です。

本製品は、イルミナ社の次世代シーケンサー用ライブラリーを、リアルタイム PCR 装置を用いて定量するためのキットです。イルミナ社の次世代シーケンサーに用いられるアダプター配列を特異的に認識するプライマー・プローブと専用のスタンダード DNA を用いるため、アダプターが連結していない DNA 分子が混在していても、シーケンサーで解析対象となるアダプターが連結した DNA 分子のみを定量することが可能です。また、ライブラリーの調製過程において、ライブラリーとアダプターの連結の確認に用いることもできます。

増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法です (下図)。

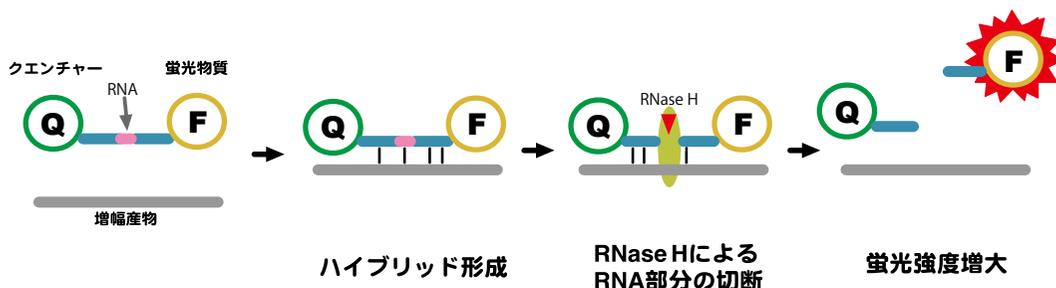


図1. サイクリングプローブ法の原理

プローブは、RNA 部を挟んで一方が蛍光物質で、他方はその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質 (クエンチャー) で標識されています。インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分が切断されると強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。プローブの RNA 部分もしくは RNA 部分の 1 塩基 5' 側の塩基がミスマッチの場合には RNase H による切断がおこらないことを利用して、1 塩基の違いを識別する特異性の高い検出が可能です。

I. 内容 (25 μ l 反応、50 回分)

1. 2 \times Cycleleave Reaction Mixture	625 μ l
2. Primer/Probe Mix (FAM) (5 \times conc.) *	250 μ l
3. EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml \times 5
4. dH ₂ O	1 ml
5. ROX Reference Dye (50 \times conc.) *	25 μ l
6. ROX Reference Dye II (50 \times conc.) *	25 μ l
7. Standard (10 pM)	50 μ l

* : 蛍光標識プローブ・蛍光色素を含んでいますので、遮光に留意してください。

【コンポーネントの説明】

2 \times Cycleleave Reaction Mixture :

酵素、Buffer と dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。

Primer/Probe Mix (FAM) :

PCR 反応に用いるプライマーとプローブの混合溶液です。

EASY Dilution (for Real Time PCR) :

スタンダード DNA とライブラリー DNA の希釈用溶液です。

単品でも購入できます。EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)

ROX Reference Dye、ROX Reference Dye II :

Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

- ◆ ROX Reference Dye を添加する機種
 - ・ StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ ROX Reference Dye II を添加する機種
 - ・ Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ 添加の必要がない機種
 - ・ Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ (製品コード TP900/TP960 など)

Standard :

ライブラリー定量を行う際の検量線の作成に用いる 10 pM スタンダード DNA 溶液です。Cycleleave qPCR 定量用にデザインされているため、他のリアルタイム PCR 手法に用いた場合、定量の誤差や不良を引き起こすことがあります。

II. 保存

− 20°C

III. キット以外に必要なもの (主なもの)

【機器】

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ

- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Software Ver. 3.00 以降) (製品コード TP900/960)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)

※ チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 0.2 ml 8 連チューブを Thermal Cycler Dice Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミネーションの危険性を軽減できるので特にお勧めします。

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

- StepOnePlus Real-Time PCR System
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

【その他】

1,000 μ l、200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット

マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)

卓上遠心機

微量高速遠心機 (4°C 設定可能)

IV. 操作上の注意

- リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
- 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
- 反応液の調製から検出まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1： 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2： ライブラリーとスタンダード DNA の希釈を行います。
 - エリア 3： ライブラリー希釈液とスタンダード DNA の反応液への添加と、反応および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

- 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって定量を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。
- 本キットで定量可能なライブラリーは以下のキットで調製したものとなります。

No.	キット名	メーカー	カタログ番号
1	TruSeq RNA Library Preparation Kit v2、Set A	イルミナ	RS-122-2001
2	TruSeq RNA Library Preparation Kit v2、Set B		RS-122-2002
3	TruSeq DNA PCR-Free LT Library Preparation Kit - Set A		FC-121-3001
4	TruSeq DNA PCR-Free LT Library Preparation Kit - Set B		FC-121-3002
5	TruSeq Nano DNA LT Library Preparation Kit - Set A		FC-121-4001
6	TruSeq Nano DNA LT Library Preparation Kit - Set B		FC-121-4002
7	TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit Set A		RS-122-2101
8	TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit Set B		RS-122-2102
9	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat Set A		RS-122-2201
10	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat Set B		RS-122-2202
11	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Gold Set A		RS-122-2301
12	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Gold Set B		RS-122-2302
13	SureSelect ^{XT} Target Enrichment System	アジレント テクノロジーズ	

V. 操作

< 操作の概要 >

1. スタンダード DNA の希釈
検量線作成に用いる Standard (10 pM) の希釈を行います。
2. ライブラリーの希釈
検量線の範囲に収まるように DNA の希釈を行います。

【注意点】

- A) 初めて本キットをご使用される方は、すでにシーケンスを行ったことがあるライブラリーを同時に定量することを推奨します。解析機種や試薬・解析ソフトウェアのバージョンによって、最適なインストール濃度は異なります。既にシーケンスしたライブラリーの定量結果は、インストール濃度を決定する際の参考情報となります。
- B) 定量誤差が生じる原因の一つとして、スタンダード DNA とライブラリーとの増幅効率の差異が考えられます。
増幅効率がスタンダード DNA よりも低いライブラリーは、本来の濃度よりも低く評価される傾向にあります。そのため、通常のライブラリーと同じインストール濃度でシーケンスを行うと、クラスター密度が高くなる場合があります。高い GC 含量、複雑な高次構造をとりうるライブラリーの場合は、PCR 増幅効率が低くなる可能性がありますので、事前に希釈系列による反応を行い、スタンダード DNA との増幅効率の差を確認してください。
- C) すでにシーケンスを行ったことがある、定量を目的とするライブラリーと同一のライブラリー作製法で調製し、検体の種類が同様のライブラリーをお持ちの場合は、対照検体として同時に定量を行い、そのシーケンスのクラスター形成数を参考値としてインストール濃度の補正を行うことを強く推奨します。

以下の工程は用いるリアルタイム PCR 機器により異なります。

3. 反応液の調製と反応開始

反応液を調製する



反応液を反応チューブに分注し、希釈したスタンダード DNA、陰性コントロール、またはライブラリーを添加する



反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する

4. 結果表示

画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される



反応終了



判定

V-1. スタンダード DNA の希釈 (0.01 ~ 10 pM) * (エリア 2 で実施)

- 1) 3本の 1.5 ml チューブに EASY Dilution (for Real Time PCR) を 45 μ l ずつ分注する。
- 2) 5 μ l の Standard (10 pM) を 1) のチューブの 1 本に加え、良く混合し、Standard (1 pM) を調製する。
- 3) 同様の操作により、0.1 pM および 0.01 pM の Standard を調製する。

* : DNA の安定性を考慮し、用時調製することを推奨します。

V-2. ライブラリーの希釈 (エリア 2 で実施)

解析に用いるライブラリーの一部をおよそ 1 pM となるように付属の EASY Dilution (for Real Time PCR) で希釈する。正確な希釈を行うため、スタンダード DNA と同様の段階希釈を推奨する。ライブラリーのモル濃度が不明の場合は、規定濃度 (w/v) から以下の式を参考に算出する。

- 1) ライブラリーの分子量の算出
ライブラリーの分子量 = ライブラリーサイズ (bp) × 660
- 2) ライブラリーモル濃度の算出
ライブラリーモル濃度 (nM) = ライブラリー濃度 (ng/μl) × 10⁶ / ライブラリーの分子量

V-3. 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
鋳型 (ライブラリーサンプルまたはスタンダード DNA) 以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、反応チューブに 23 μl ずつ分注後、軽くふたをする。必要本数は、サンプル数 + 5 本 (スタンダード DNA (4 段階濃度) と陰性コントロール) とする。試行回数を増やすことにより定量の精度向上が期待できる。
陰性コントロールのチューブには、滅菌水 2 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。

< Thermal Cycler Dice Real Time System // を用いる場合 >

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
Primer/Probe Mix (FAM) (5 × conc.)	5 μl	1 ×
検体サンプル or スタンダード DNA or 滅菌水	(2 μl) *1	
dH ₂ O	5.5 μl	
Total	25 μl	

< StepOnePlus および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合 >

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
Primer/Probe Mix (FAM) (5 × conc.)	5 μl	1 ×
ROX Reference Dye (50 × conc.) or Dye II (50 × conc.) *2	0.5 μl	1 ×
検体サンプル or スタンダード DNA or 滅菌水	(2 μl) *1	
dH ₂ O	5 μl	
Total	25 μl	

- * 1 : 希釈したライブラリーやスタンダード DNA (鋳型) は、この段階では加えない。
- * 2 : StepOnePlus で解析する場合には ROX Reference Dye (50 ×) を、7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には ROX Reference Dye II (50 ×) を使用する。

- 2) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)

1) で分注した陰性コントロール以外のチューブの調製液に、希釈したライブラリーやスタンダード DNA を 2 μl 添加し、しっかりと蓋をする。

【注意】蛍光測定を行うため、チューブに汚れがつかないように注意してください。蓋をする際は手袋を着用してください。

- 3) 反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心して、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

V-4. リアルタイム PCR 装置による定量 (エリア 3 で実施)

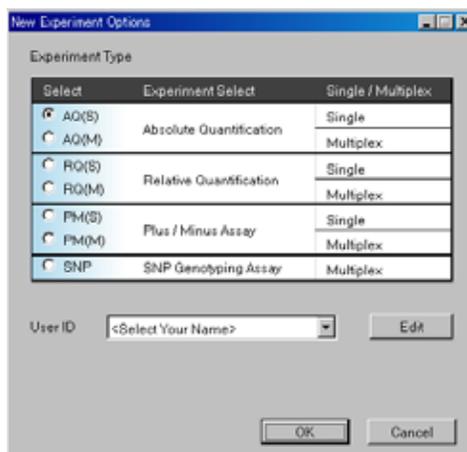
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている取扱説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System // と StepOnePlus Real-Time PCR System を使用した場合の、それぞれの簡単な操作方法について示します。

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System については、StepOnePlus をご参照ください。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System // の場合 】

- 1) ランファイルを新規作成し、AQ (S) Absolute Quantification Single を選択する。



※ Thermal Cycler Dice Real Time System Software Ver 4.01A を用いた使用例を示しています。

- 2) Plate Setup の Target & Sample Setting 画面で検出する Dye として FAM を、Sample list にスタンダード (STD) と定量するライブラリー (UNKN) を登録し、Update ボタンを押す。

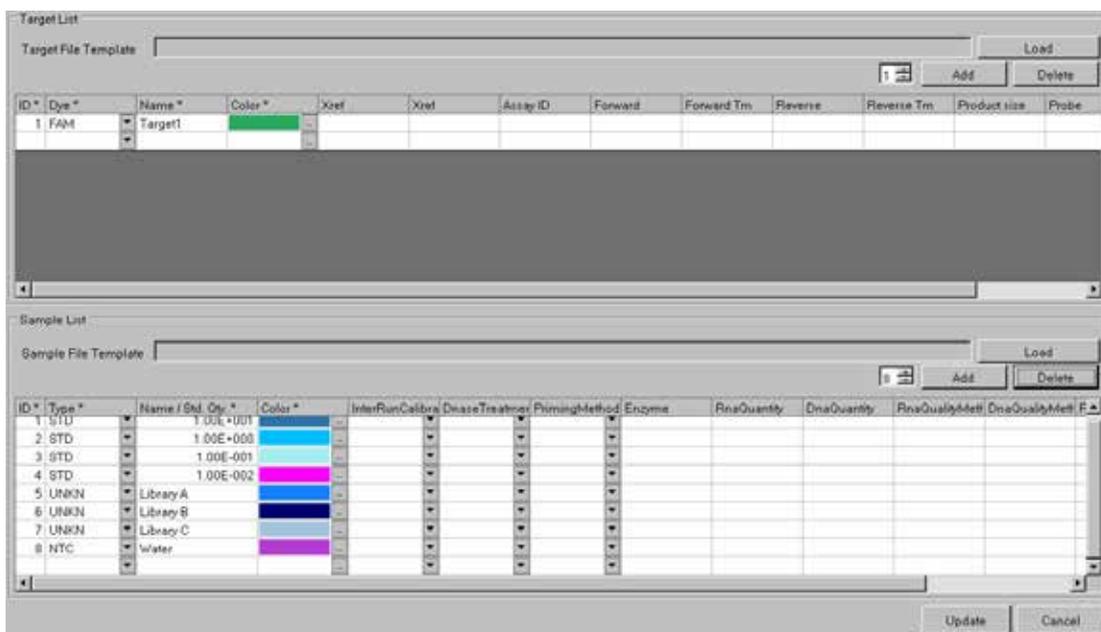
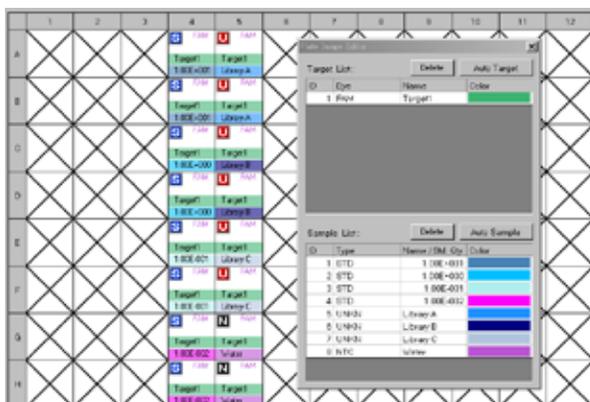


Plate Setup の Plate Image の画面で Update した条件を解析予定のウェルに登録します。下図は n=2 で作業を行う場合を示しています。



3) 反応条件設定画面で、以下の反応条件の登録を行います。

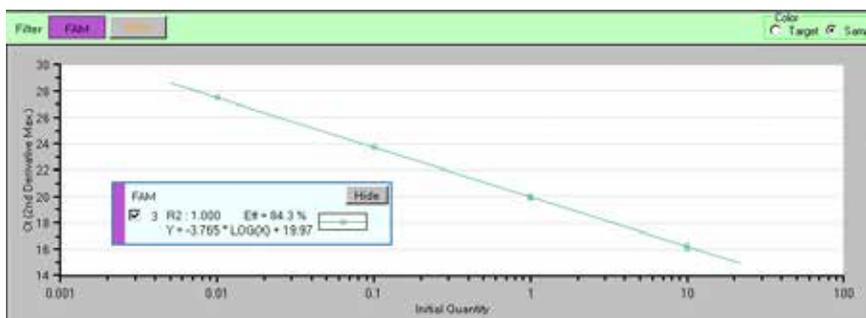


初期変性 (Hold)
 Cycle : 1
 95°C 1分
 3 step PCR
 Cycle : 45
 95°C 5秒
 55°C 10秒
 72°C 60秒 (検出)

4) 画面右下の "Start Run" ボタンをクリックし、任意の Run File 名を付けて反応を開始する。

5) 結果解析

- 反応終了後、検出フィルター FAM を選択し、Result/Analysis の画面において、Analysis Data で「Standard Curve」、Fluorescence で「2nd Derivative Max」を選択し、検量線の R2 が 0.99 以上でかつ増幅効率 (Eff) が 70% 以上であることを確認する。下図に典型的な検量線を示す。



- Result/Analysis の画面において、Analysis Data で「Text Report」、Fluorescence で「Data Set of Each Well」、もしくは「Data Set of Replicate」を選択する。Qty (SDM) の値が希釈したライブラリーの濃度 (pM) を示す。以下の式を参考にライブラリー濃度を算出する。

$$\text{ライブラリー濃度 (nM)} = \text{希釈倍率} \times \text{Qty (SDM) の値} / 1,000$$

【 StepOnePlus Real-Time PCR システムの場合 】

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System をご使用の場合は、StepOnePlus Real-Time PCR System と同じ設定で反応が可能です。

- 1) StepOne Software を立ち上げ、画面左上の File メニューの New Experiment から、Advanced Setup を選択する。
- 2) Experiment Properties のメニューで、type of experiment は Quantitation – Standard Curve を、reagents は Other を、ramp speed は Fast を選択する (下図)。

The screenshot shows the 'Experiment Properties' dialog box in StepOne Software. It is divided into three sections:

- What type of experiment do you want to set up?:** This section has six buttons. 'Quantitation - Standard Curve' is selected and highlighted in yellow. Other buttons include 'Quantitation - Relative Standard Curve', 'Quantitation - Comparative Ct (ΔΔCt)', 'Melt Curve', 'Genotyping', and 'Presence/Absence'. Below the buttons is the text: 'Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.'
- Which reagents do you want to use to detect the target sequence?:** This section has three buttons: 'TaqMan® Reagents', 'SYBR® Green Reagents', and 'Other'. 'Other' is selected and highlighted in yellow. Below the buttons is the text: 'The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and other reagents to detect amplification. The Reaction Setup screen is not available for "Other" reagents.' There is a checked checkbox for 'Include Melt Curve'.
- Which ramp speed do you want to use in the instrument run?:** This section has two buttons: 'Standard (~ 2 hours to complete a run)' and 'Fast (~ 40 minutes to complete a run)'. 'Fast' is selected and highlighted in yellow. Below the buttons is the text: 'For optimal results with the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your PCR reactions.'

※ここでは、StepOne Software v2.1 を使用した場合の例を示しています。

- 3) Plate Setup の Define Targets and Samples のメニューで、Define Target のウィンドウにおいて Reporter は FAM を、Quencher は TAMRA を選択し、Define Samples のウィンドウにおいて定量を行うライブラリーの名称を入力し、画面右下の Assign Targets and Samples をクリックする。

The screenshot shows the 'Define Targets and Samples' dialog box in StepOne Software. It has two tabs: 'Define Targets and Samples' (selected) and 'Assign Targets and Samples'. The 'Define Targets and Samples' tab is divided into three sections:

- Define Targets:** This section has buttons for 'Add New Target', 'Add Saved Target', 'Save Target', and 'Delete Target'. Below these buttons is a table with columns: 'Target Name', 'Reporter', 'Quencher', and 'Color'. The table contains one row: 'Target 1', 'FAM', 'TAMRA', and a blue color swatch.
- Define Samples:** This section has buttons for 'Add New Sample', 'Add Saved Sample', 'Save Sample', and 'Delete Sample'. Below these buttons is a table with columns: 'Sample Name' and 'Color'. The table contains three rows: 'Library A' (blue), 'Library B' (green), and 'Library C' (yellow).
- Define Biological Replicate Groups:** This section has buttons for 'Add Biological Group' and 'Delete Biological Group'. Below these buttons is a table with columns: 'Biological Group Name', 'Color', and 'Comments'. The table is currently empty.

At the bottom right of the dialog box is a button labeled 'Assign Targets and Samples'.

- 4) 次に Assign Targets and Samples のメニューで、Define Targets and Samples で決定した条件を解析予定のウェルに登録する。下図は n=2 で行った場合の例を示す。

Target 1 10 FAM-TAMRA	Target 1 10 FAM-TAMRA	Target 1 1 FAM-TAMRA	Target 1 1 FAM-TAMRA	Target 1 0.1 FAM-TAMRA	Target 1 0.1 FAM-TAMRA	Target 1 0.01 FAM-TAMRA	Target 1 0.01 FAM-TAMRA
Library A Target 1 FAM-TAMRA	Library A Target 1 FAM-TAMRA	Library B Target 1 FAM-TAMRA	Library B Target 1 FAM-TAMRA	Library C Target 1 FAM-TAMRA	Library C Target 1 FAM-TAMRA	Target 1 FAM-TAMRA	Target 1 FAM-TAMRA

- 5) Run Method のメニューで、PCR の反応条件を入力する。

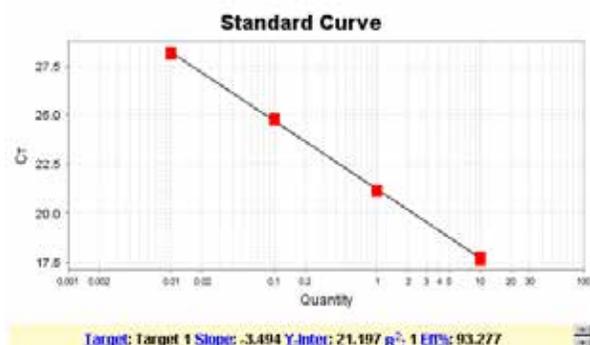


Reaction Volume per Well : 25 μ l
 初期変性 (Hold)
 Cycle : 1
 95°C 1分
 3 step PCR
 Cycle : 45
 95°C 5秒
 55°C 10秒
 72°C 60秒 (検出)

- 6) 画面右上の START RUN ボタンを押し、PCR 反応を開始する。

- 7) 結果解析

- 反応終了後、検量線の R^2 が 0.99 以上でかつ増幅効率 (Eff%) が 70% 以上であることを確認する。下図に典型的な検量線を示す。



- Analysis の画面で Quality の値を確認する。Quality が希釈したライブラリーの濃度 (pM) を示す。以下の式を参考にライブラリー濃度を算出する。
 ライブラリー濃度 (nM) = 希釈倍率 \times Quality の値 / 1,000

■ 判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロール反応 (NTC) で、FAM フィルターにおいて増幅曲線が得られた場合
→ コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。
- ・ スタンダード DNA の反応で、FAM フィルターで増幅曲線が得られなかった場合
→ 何らかの原因で PCR、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。Primer/Probe Mix (FAM) に問題がある、または、スタンダード DNA が分解している可能性も考えられる。
- ・ 希釈ライブラリーを鋳型とする反応で、FAM フィルターで増幅曲線が得られなかった場合
→ 何らかの原因で PCR、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再反応を行う。または検体サンプルの再調製を行い、再反応を行う。
調製したライブラリーのアダプターが、本キットに付属している Primer/Probe では認識することができない可能性も考えられる。詳しくは、IV. 操作上の注意を確認してください。
- ・ 検量線の R2 が 0.99 未満の場合
→ スタンダードの希釈、スタンダード DNA の反応液への添加が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 検量線の増幅効率 (Eff) が 70% 未満だった場合
→ 反応溶液 (2 × Cycleave Reaction Mixture) の失活が考えられる。また、反応液中に反応阻害物質がコンタミネーションした可能性がある。
- ・ 希釈したライブラリーの定量結果が、検量線の範囲 (0.1 ~ 10 pM) に収まらなかった場合
→ 正しく定量されていない可能性がある。定量結果を踏まえ、ライブラリーの希釈からやり直す。

■ インストール濃度を決定する際の注意事項

- ・ インストールする DNA 濃度は、使用するシーケンサー、試薬や解析ソフトウェアのバージョンによって異なります。すでにシーケンスを行ったことがあるライブラリーを合わせて定量し、その結果を参照することにより最適なインストール濃度を決定することを推奨します。
- ・ PCR をベースとした定量手法であるため、ライブラリーのサイズ・構成配列によっては、PCR の増幅反応性の違いにより定量誤差が生じる場合があります。対照検体としてシーケンスを行ったことがある同一のライブラリー作製法で調製し、検体の種類が同様のライブラリーを定量した場合は、そのシーケンスの結果よりインストール濃度の調整を行ってください。
- ・ 定量誤差が生じる原因の一つとして、スタンダード DNA とライブラリーとの増幅効率の差異が考えられます。
増幅効率がスタンダード DNA よりも低いライブラリーは、本来の濃度よりも低く評価される傾向にあります。そのため、通常のライブラリーと同じインストール濃度でシーケンスを行うと、クラスター密度が高くなる場合があります。
高い GC 含量、複雑な高次構造をとりうるライブラリーの場合は、PCR 増幅効率が低くなる可能性がありますので、事前に希釈系列による反応を行い、スタンダード DNA との増幅効率の差を確認してください。
- ・ 最適なクラスター密度については、使用するシーケンサー、試薬や解析ソフトウェアのバージョンにより異なります。詳細はイルミナ社にお問い合わせください。

■多検体シーケンス (Multiplexed Sequence) を行う際の注意点

ライブラリーの混合操作を行う際に、ピペット操作のブレにより、配列リード数にバラつきが生じる懸念があります。濃度が大きく異なるライブラリー同士を混合する場合は、事前に濃度が高いライブラリーの希釈を行い、濃度をおおよそそろえてから混合することを推奨します。また、この場合のピペット操作は2 μ l以上で行うことをお勧めします。

■本キットの使用例

Paired-End DNA Sample Prep Kit (イルミナ社 Code. PE-102-1001) と Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit (イルミナ社 Code. PE-400-1001) を用いて、12種類のゲノムライブラリーを調製し、本キットを用いてライブラリーの定量を行った。ライブラリーのインストール濃度がそれぞれ1 pM となるように混合を行い、多検体シーケンスを行った (下図 a)。同様に、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いてライブラリーの定量を行い、インストール濃度がそれぞれ0.75 pM となるように混合を行い、多検体シーケンスを行った (下図 b)。

本キットの定量結果を用いてシーケンスを行った場合、ライブラリーの収量はおおよそ同じであった。一方、Agilent 2100 Bioanalyzer による定量結果を用いてシーケンスを行った場合には取得リード数が少ない検体が生じた。

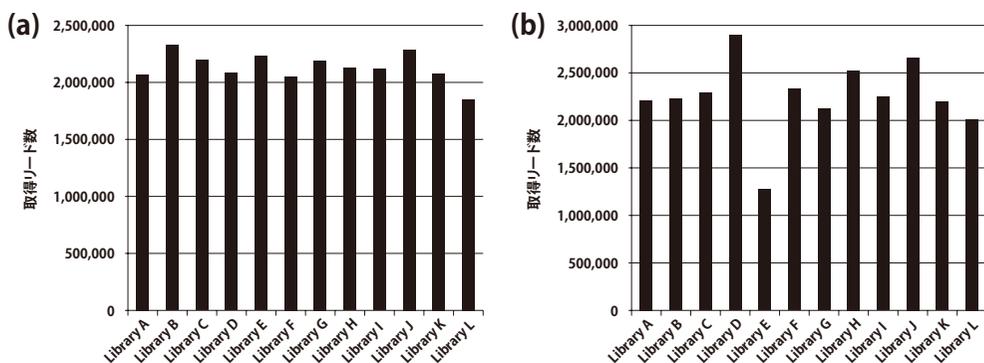


図2. 本キットと Agilent 2100 Bioanalyzer との定量手法を用いた多検体混合シーケンスの結果

- (a) 本キットを用いてライブラリー定量を行った場合の各検体の取得リード数
- (b) Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて定量を行った場合の各検体の取得リード数

シーケンス仕様

シーケンサー : Genome Analyzer IIx

解析ソフトウェア : SCS2.8

シーケンス試薬 : TruSeq SR Cluster Kit v5-CS-GA (イルミナ社 Code. GD-203-5001)、TruSeq SBS Kit v5-GA (イルミナ社 Code. FC-104-5001)

VI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
96well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400)
Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
Plate Sealing Pads (製品コード 9090)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)

<イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット：インターカレーター法>
Library Quantification Kit (製品コード 638324)

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社