

SMART-Seq® mRNA HT LP

SMART-Seq® mRNA HT LP (製品コード 634792、634793、および 634794) は、1~100 個の細胞または 10 pg~1 ng の total RNA (RIN ≥8) からイルミナ社の高速シーケンスプラットフォームにおける次世代シーケンス (NGS) 解析に適したインデックス付きの DNA ライブラリーを調製することが可能な試薬です。これらは Unique Dual Index Kits (製品コード 634752~634756) と併せて使用します。通常、作業は 6 時間で完了します。cDNA 合成のみを目的とする場合は SMART-Seq® mRNA HT (製品コード 634791、634795、もしくは 634796) をお使いください。

本日本語版 At-A-Glance は、英語版ユーザーマニュアル Version 051123 に基づいて作成していますが、実際に製品を使用される際には、必ず[英語版ユーザーマニュアル \(最新版\)](#) を参照してください。

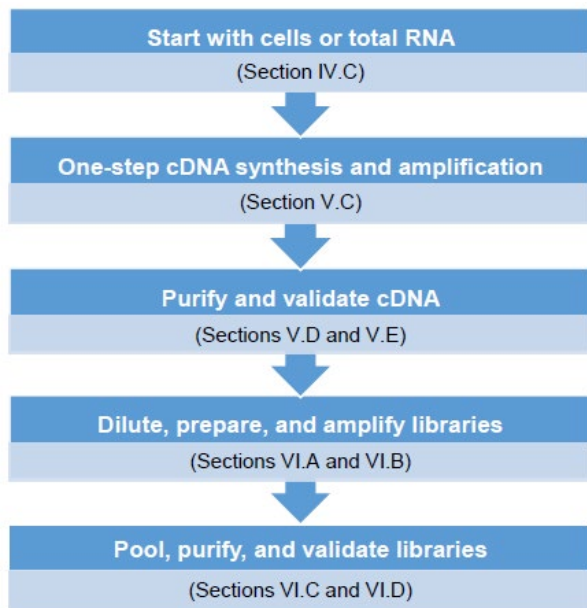


図 1. SMART-Seq® mRNA HT LP protocol overview

■ 製品に含まれるもの

表 1. SMART-Seq® mRNA HT LP 構成試薬

SMART-Seq mRNA	634792 (24 rxns)	634793 (96 rxns)
SMART-Seq mRNA HT	643795*	634796*
Box 1 (Store at -70°C)		
Control Total RNA† (1 µg/µl)	5 µl	5 µl
Box 2 (Store at -20°C)		
SMART-Seq HT Oligonucleotide	24 µl	96 µl
3' SMART-Seq CDS Primer II A	48 µl	192 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	60 µl	150 µl
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100 U/ µl)	48 µl	192 µl
One-Step Buffer	250 µl	1 ml
SeqAmp™ DNA Polymerase	20 µl	50 µl
10X Lysis Buffer‡§	500 µl	1.85 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)**	1.7 ml	6.8 ml
Nuclease-Free Water‡	1 ml	4 ml
SMART-Seq Library Prep Kit (Store at -20°C)	634764††	R400747††
10X FE	24 µl	60 µl
FE Dilution Buffer	250 µl	1 ml
Lib Prep Buffer	120 µl	480 µl
Lib Prep Enzyme	70 µl	280 µl
Rxn Enhancer	100 µl	400 µl
Stem-Loop Adapters	120 µl	480 µl
Amplification Buffer	600 µl	2 x 1.2 ml
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (5 U/µl)	30 µl	120 µl
Nuclease-Free Water	1 ml	4 x 1 ml

■ 保管と取り扱い

キット到着後、Box 1 は -70°C、Box 2 は -20°C で保管してください。酵素試薬は、使用直前に氷上に移してください。解凍後の試薬は、チューブを短時間ボルテックスおよび遠心機でイクスピンスピンします。

■ 開始前に確認しておくこと

- 本アッセイは、サンプル調製時のピペッティングの分注精度に敏感です。正しく校正されたピペットを使用してください。
- one-step RT-PCR に関連するすべての試薬は、核酸およびヌクレアーゼフリーのキャビネット内で保管してください。
- 反応液を調製する際、酵素は最後に添加し、穏やかなピペッティング操作で混合してください。
- 本キットを使用する際、試薬が適切に機能していることを確認するためにはコントロールサンプルを置いてください。

■ 使用するサンプルについて

- 1~100 個のインタクトな細胞または微量の total RNA (10 pg~1 ng) からのライブラリー調製に最適な性能を期待できます。固定化された細胞サンプルには使用できません。
- 希釈の前に培養細胞サンプルから培地除去をするには Mg²⁺- and Ca²⁺-free PBS で 2 回以上洗浄することをお勧めします。細胞をソートする際には、推奨のソーティングバッファーをご使用ください (詳細は英語版ユーザーマニュアルの Section IV.C を参照)。
- 本キットで使用可能な RNA の最大液量は 10.5 µl です。

- RNA の精製方法やキットを選択する際には、サンプルの量が適切であるか確認してください。

■ SMART-Seq® mRNA HT LP Protocol

サンプルの調製

A. ソートされた細胞から開始する場合

- コントロールの分も含めて、総サンプル数×1.1 倍量の CSS(CDS Sorting Solution) を調製する。

CDS Sorting Solution (CSS; with 3' SMART-Seq CDS Primer II A):

	Per well	1-18 wells*
10X Lysis Buffer	0.95 µl	19 µl
RNase Inhibitor	0.05 µl	1 µl
3' SMART-Seq CDS Primer II A	1 µl	20 µl
Nuclease-Free Water	10.5 µl	210 µl
Total volume	12.5 µl	250 µl

- ※少ない量でピペティングするため、250 µl 以上（18 ウェルに必要な量）のソーティングバッファーを準備する。
- 軽く混ぜてからクイックスピンする。
※Lysis Buffer には界面活性剤が含まれているため、混合時に泡が発生しないように注意する。
- 12.5 µl ずつ CSS を PCR チューブまたは 96-well plate に分注する。
- PCR チューブまたは 96-well plate の蓋をして、遠心機でクイックスピンする。
- PCR チューブまたは 96-well plate を -20°C で最短 10 分間、最長 24 時間保管する。
※ソーティングバッファーの量が少ないため、使用直前で -20°C で保管する。
- 細胞をソートする準備ができたなら、準備しておいた PCR チューブもしくは 96-well plate の蓋を開封し、FACS の操作手順に従って細胞をソートする。
- PCR チューブであれば蓋を閉じ、96-well plate であればアルミホイルシールで密封する。蒸発を最低限に抑えるためにしっかり閉じる。
- 遠心機でクイックスピンする。
- サンプルをドライアイス上に置き、細胞を急速冷凍する。
※PCR チューブで凍結させる場合は、チューブラックでチューブを固定する。
- cDNA 合成の準備が整うまでサンプルを -80°C で保管する。

※長期間の -80°C 保管は cDNA 合成の効率に影響を及ぼす可能性があるため、保管は数週間程度に抑えてください。

11. ポジティブコントロールを準備する場合は、**B) RNA もしくは細胞サンプルから開始する場合**へ進む。

B. RNA もしくは細胞サンプルから開始する場合

Control RNA の希釈（ポジティブコントロールの準備）

- 396 µl の Nuclease-Free Water に 4 µl の RNase Inhibitor を加え、ボルテックスで混合後氷上に静置する。これを RNase Inhibitor Water (RI Water) とする。
- 新しい 0.2 ml チューブに 38 µl の RI Water と 2 µl の Control Total RNA (1 µg/µl) を混合し 50 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 45 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (50 ng/µl) を加え混合し 5 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 95 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (5 ng/µl) を混合し 0.25 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 120 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (0.25 ng/µl) を混合し 10 pg/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 45 µl の RI Water と 5 µl の 10 pg/µl Control Total RNA を混合し 1 pg/µl Control Total RNA を作製する。
- 2-10 µl の 10 pg/µl Control Total RNA もしくは 10 µl の 1 pg/µl Control Total RNA をポジティブコントロールとして使用する。
- 10X Reaction Buffer 溶液を作製し（サンプル数に応じて作製量を変更すること）、軽く混合してから遠心機でクイックスピンする。

19 µl	10X Lysis Buffer
1 µl	RNase Inhibitor
20 µl	Total volume per reaction

※Lysis Buffer には界面活性剤が含まれているため、混合時に泡が発生しないように注意する。

9. 精製済の total RNA 1~10.5 µl を新しい PCR チューブまたは 96-well plate に移す。必要に応じて、Nuclease-Free Water

を加えて総量を 10.5 μ l にする。コントロールサンプルについては表 2 を参考に調製する。

表 2. 逆転写反応サンプル調製

Components	Negative control	Positive control	Experimental sample
10× Reaction Buffer	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Nuclease-Free Water	10.5 μ l	Up to 9.5 μ l	Up to 9.5 μ l
Diluted Control RNA	—	1-10.5 μ l	—
Sample	—	—	1-10.5 μ l
Total volume	11.5 μl	11.5 μl	11.5 μl

10. 10X Reaction Buffer を 1 μ l ずつ各サンプルに添加する。

11. サンプルを氷上に置き、1 μ l の 3' SMART-Seq CDS Primer II A を加える。軽くボルテックスで混合し、遠心機でクイックスピンする。

12. 速やかに次の工程に進む。

逆転写反応から 2 本鎖 cDNA 増幅

コンタミネーションを防ぐため、クリーンな環境で作業を実施してください。

1. One-Step Buffer のみ室温で解凍し、その他の 1 本鎖 cDNA 合成に必要な試薬（酵素は除く）は氷上で解凍する。

- Nuclease-Free Water
- SMART-Seq HT
- Oligonucleotide, RNase Inhibitor
- 3' SMART-Seq CDS Primer II A (必要に応じて使用)

上記の試薬を軽くボルテックスで混合し、クイックスピン後、氷上に静置する。ただし、One-Step Buffer は室温で静置する。

2. オプション：細胞サンプルを扱う場合、プレートもしくは PCR チューブを保冷庫から取り出して遠心機でクイックスピンする。

※この時点で sorting buffer に 3' SMART-Seq CDS Primer II A を添加していない場合は、それぞれのサンプルに氷上で 3' SMART-Seq CDS Primer II A を 1 μ l 添加する。

3. 予熱しておいたサーマルサイクラーでサンプルを 72°C (with a heated lid)、3 分間インキュベートする。

4. サンプルの反応中に、総サンプル数×1.1 倍量の One-Step Master Mix を室温で作製する。

※One-Step Master Mix を使用する直前まで酵素は添加しない。

※SeqAmp DNA Polymerase の使用量は厳密である必要があるため、1 度に作製する One-Step Master Mix は 12 サンプル分以上の量を推奨する。

One-Step Master Mix:

0.7 μ l	Nuclease-Free Water
8 μ l	One-Step Buffer
1 μ l	SMART-Seq HT Oligonucleotide
0.5 μ l	RNase Inhibitor
0.3 μ l	SeqAmp DNA Polymerase
2 μ l	SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U/ μ l)
12.5 μl	Total volume per reaction

5. 作製した One-Step Master Mix はボルテックスで穏やかに、かつ十分に混合し、遠心機でクイックスピンする。

6. 72°C (with a heated lid) で 3 分間インキュベートし、速やかに氷上に移動して 2 分以上静置する。(ただし 10 分以上は置かないこと)

7. サーマルサイクラーを 42°C に予熱しておく。

8. One-Step Master Mix に SMARTScribe Reverse Transcriptase と SeqAmp DNA Polymerase を添加し、ボルテックスで穏やかに、かつ十分に混合する。その後遠心機でクイックスピンする。

9. それぞれのサンプルに 12.5 μ l の One-Step Master Mix を加え、穏やかなボルテックスで十分混合した後、遠心機でクイックスピンする。

10. プレートまたはチューブを、42°C に予熱しておいたサーマルサイクラー (with a heated lid) へセットし反応を開始する。

42°C	90 min
95°C	1 min
N cycles*:	
98°C	10 sec
65°C	30 sec
68°C	3 min
72°C	10 min
4°C	forever

※サイクル数は表 3 と表 4 を参照すること。

表 3. 細胞株と精製 RNA サンプルの推奨 PCR サイクル数

Input amount of total RNA	Input amount of cells	Recommended PCR cycles
1 ng	100 cells	10-11
100 pg	10 cells	14-15
10 pg	1 cell	17-19

表 4. シングルセルサンプルの推奨 PCR サイクル数

Sample type	Approximate RNA content	Recommended PCR cycles
K562/HEK293	10 pg	17-18
Jurkat	5 pg	18-19
B or T cells	2 pg	20
PBMCs	1 pg	20

※21 以上のサイクル数については推奨しない。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで長期間保管可能

増幅した cDNA 産物の精製

1. 事前の試薬準備

- NucleoMag NGS Clean-up and Size Select beads (製品コード 744970)を新しい 1.5 ml チューブに必要量移し、これと Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)を少なくとも 30 分間室温に戻す。ボルテックスでよく攪拌する。
- ビーズ量：サンプル量は 1:1 とする。
- 1 サンプルにつき 400 µl の新鮮な 80%エタノールを準備する。

2. それぞれのサンプルに 25 µl のビーズを添加し、3~5 秒間ボルテックスまたは 10 回以上のピペッティングでしっかり攪拌する。

3. 室温で 8 分間インキュベートして、cDNA をビーズに結合させる。

4. サンプルを遠心機でクイックスピンする。

5. サンプルを磁気分離装置上に 5 分間以上置き、上清が完全に透明であることを確認する。

6. サンプルを磁気分離装置にセットした状態で、上清を取り除く。

7. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。

8. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。cDNA はビーズに結合したままである。

9. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。

10. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。

11. サンプルを遠心機でクイックスピンする。

12. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。

13. ペレットの光沢がなくなり亀裂が入る直前まで、サンプルを室温で約 2~2.5 分間インキュベートする。

※ビーズの乾燥が進みペレットに亀裂が生じると、DNA がビーズから溶出されにくくなり、結果的に収量が低下する可能性があるので注意する。

14. サンプルを磁気分離装置から外し、17 µl の Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)を加えてペレットを覆う。

15. ピペッティングまたは穏やかなボルテックスでビーズを完全に懸濁する。

16. サンプルを室温で 2 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。

17. サンプルを磁気分離装置にセットして 1 分以上静置し、上清が透明になるまで待つ。

18. 精製 cDNA を含む透明な上清を、新しいチューブまたはプレートに移す。ビーズを持ち込まないように注意する。

19. 速やかに次の工程に進めるか、サンプルを -20°Cで保管する。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを -20°Cで一時的に保管可能

cDNA の品質確認

A. cDNA の分子量確認

【使用推奨機器】

- Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, 製品コード 5067-4626)
- Fragment Analyzer and High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit (Agilent, 製品コード DNF-464)
- High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, 製品コード 5067-5592)

- それぞれの cDNA 増幅産物 1 µl を Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Kit で解析する。機器の使用方法については、機器製造元の説明書を参照すること。

cDNA 合成と増幅が成功した場合、Agilent High Sensitivity DNA Kit においてポジティブコントロールで 400 ~ 10,000 bp の範囲に増幅産物が見られ、ピーク長は約 2,500 bp となる。ネガティブコントロールについては、何もなくフラットである必要があるが、場合によっては 100~300 bp の範囲に少量の生成物が見られることがあります。

B. cDNA の収量確認

増幅した cDNA の濃度を正確に定量するために、Agilent High Sensitivity DNA Kit の使用を推奨します。Agilent High Sensitivity DNA Kit において 400~9,000 bp の範囲を選択し、ds cDNA の濃度を算出してください。機器の使用方法については、機器製造元の説明書を参照してください。

- cDNA の収量を測定する。

Agilent High Sensitivity DNA Kit においてフラットな波形が見られるようなネガティブコントロールについて、PicoGreen または Qubit を使用し cDNA を定量すると、最大 200 pg/µl の収量が確認される場合があります。これは低分子量のプライマーまたはプライマーダイマーに起因します。

- サンプルとコントロールの結果を比較する。
- イルミナシーケンシングのためのライブラリー調製へ進む。

cDNA 産物の希釈とライブラリーの調製

- ライブラリーの調製と増幅を同日に実施する場合、以下の試薬を氷上で解凍する。

- Unique Dual Index Kits (製品コード 634752~634756)
- SMART-Seq Library Prep Kit components: FE Dilution Buffer, Lib Prep Buffer, Rxn Enhancer, Stem-Loop Adapters, and Amplification Buffer
- SMART-Seq mRNA Single Cell: Elution Buffer

※10X FE、Library Prep Enzyme、および PrimeSTAR HS DNA polymerase (5 U/µl) は、使用するまで -20°C の冷凍庫で保管すること。実験機の上で酵素を扱う際は、ク

ーラーを使用して酵素を冷たく保つ。

- ネガティブコントロールとして 8 µl の Elution Buffer を使用すると良い。あるいは、cDNA 合成時に用意したネガティブコントロールを使用しても良い。このネガティブコントロールは希釈せずに使用する。

cDNA 産物の希釈とライブラリーの調製終了後に反応を停止する場合は、ライブラリー増幅を開始する準備ができるまで Unique Dual Index Kit、Amplification Buffer、および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 U/µl) を -20°C の冷凍庫で保管してください。

- すべての試薬チューブをボルテックスで穏やかに混合し、軽くクイックスピンして氷上に静置する。
- 氷上で、実施する反応数に応じて PCR チューブまたは 96-well plate の各チューブ/well に 4µl の Stem-Loop Adapters を添加する。
- 定量済みの cDNA サンプルすべてについて、Elution Buffer を用いて 0.125 ng/µl~1.25 ng/µl の固定濃度に希釈する。8 µl の希釈液を次の工程で使用する。

- cDNA の希釈には脱イオン水ではなく、Elution Buffer のみを使用してください。
- ライブラリー増幅で実行する PCR サイクル数は、使用する cDNA 量によって異なります。ライブラリー増幅のサイクル条件については表 5 を確認してください。
- cDNA を希釈する際は、最低 2 µl の cDNA を使用してください。

- 希釈した cDNA サンプルまたは Elution Buffer (ネガティブコントロールとする) を、それぞれ 4 µl の Stem-Loop Adapters を添加したチューブ/well に添加する。反応液の総量は 12 µl である。
- 氷上で 10X FE を FE Dilution Buffer で希釈し、総サンプル数×1.1 倍量の 1X FE を作製する。FE Dilution Buffer は 4°C 以下で冷却しておいたものを使用する。

10X FE の分注を正確に行うために、少なくとも 40 µl (36 サンプル相当) の 1X FE を用意してください。

1X FE Preparation

	1 rxn	1-36 rxns*
FE Dilution Buffer	0.9 µl	36.0 µl
10X FE	0.1 µl	4.0 µl
Total volume	1.0 µl	40.0 µl

- 10回ピペティングで穏やかに混合し、クイックスピンした後に氷上に置く。すぐに Library Prep Master Mix の作製へ進む。
- 氷上で、総サンプル数×1.1倍量の Library Prep Master Mix を調製する。試薬は以下の順序で添加する。

Library Prep Master Mix:

4 µl	Library Prep Buffer
3.5 µl	Rxn Enhancer
2 µl	Library Prep Enzyme
1 µl	1X FE
10.5 µl	Total volume per reaction

- Library Prep Master Mix は非常に粘性が高いです。5秒間穏やかにボルテックスして十分に混合したことを確認し、チューブをクイックスピンします。必要に応じて、さらに5秒間ボルテックスし、再度クイックスピンします。氷上で保管してください。
- 残った 1X FE は再使用せずに廃棄してください。

- 氷上で 12 µl の cDNA/Stem-Loop Adapters 混合液もしくは 12 µl のネガティブコントロール/Stem-Loop Adapters 混合液に対して、10.5 µl ずつ Library Prep Master Mix を添加する。5秒間ボルテックスで混合し、クイックスピンする。
- この工程では、サーマルサイクラーに入れるまでサンプルを氷上で静置します。
 - Stem-Loop Adapters と Library Prep Master Mix を混合したマスターミックスを作製しないでください。

- PCR チューブまたは 96-well plate をサーマルサイクラーにセットし、ライブラリー調製反応を開始する。

20°C	40 min
85°C	10 min
4°C	Hold

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで1週間まで保管可能

ライブラリー増幅

- ライブラリー調製反応後にサンプルを-20°Cで保存した場合は解凍し、下記試薬と併せて氷上に置く。
- Unique Dual Index Kit

- Amplification Buffer (SMART-Seq Library Prep Kit に含まれる)
- PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 U/µl)は使用直前まで -20°Cで保管してください。
- 実験機で作業する場合は、クーラーを使用して酵素を冷たく保ってください。

- 氷上で、総サンプル数×1.1倍量の Library Amplification Master Mix を調製する。

Library Amplification Master Mix:

21.5 µl	Amplification Buffer
1 µl	PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 U/µl)
3 µl	Deionized water
25.5 µl	Total volume per reaction

Unique Dual Index Kit を使用する前に、Unique Dual Index Kits Protocol-at-a-Glance を参照してください。使用に関する詳細情報が記載されています。

- ライブラリー調製反応済の各サンプルに 25.5 µl の Library Amplification Master Mix を加える。
- それぞれのサンプルに Unique Dual Index Kit の異なるインデックスを 2 µl ずつ添加し、5秒間ボルテックスで混合した後にスピンドウンする。
- サーマルサイクラーで PCR 増幅反応を実施する。

72°C	3 min
85°C	2 min
98°C	2 min
12-16 cycles*	
98°C	20 sec
60°C	75 sec
68°C	5 min
4°C	Hold

※反応に用いる cDNA 使用量に基づく PCR サイクル数については、表 5 を参照する。

表 5. ライブラリー増幅の PCR サイクル数

Input amount of cDNA	Recommended PCR cycles
1 ng	15-16
2 ng	14-15
5 ng	13-14
10 ng	12-13

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで1週間まで保管可能

増幅したライブラリーの混合と精製

PCR 増幅したライブラリーは個別に精製可能です。また、均一な cDNA 量をライブラリー調製反応に使用している場合はオプションでライブラリーを混合することもできます(詳細は英語版ユーザーマニュアルの Section VI.A, Step 4 を参照)。

【事前の試薬準備】

- NucleoMag NGS Clean-up and Size Select beads (製品コード 744970)を 30 分以上室温に戻し、ボルテックスでよく攪拌する。溶出時は室温に戻した Nuclease-Free Water を使用する。
 - ビーズ量：サンプル量は 0.8:1 とする。
 - 1 サンプルにつき 400 μ l の新鮮な 80%エタノールを準備する。
1. 必要なシーケンシングのリード数とシーケンサーのスループット性を考慮し、混合するライブラリーの数を決定する。必要に応じて、混合する前にライブラリーを個別に精製する。

混合する方法の詳細については、「Unique Dual Index Kits Protocol-at-a-Glance」を参照してください。

2. 各サンプルから 2~8 μ l をピペッティングで 1.5 ml チューブまたは PCR チューブに移し、ライブラリーを混合する。

表 6. 混合するライブラリーの数とビーズ量

Number of libraries to be pooled	Volume per library	Total pool volume	Bead volume
8	8 μ l	64 μ l	52 μ l
12	4 μ l	48 μ l	39 μ l
16	4 μ l	64 μ l	52 μ l
24	2 μ l	48 μ l	39 μ l
32	2 μ l	64 μ l	52 μ l
48	2 μ l	96 μ l	77 μ l
96	2 μ l	192 μ l	154 μ l

3. それぞれのサンプルに 50 μ l のビーズを添加し、3~5 秒間ボルテックスまたは 10 回以上のピペッティングでしっかり攪拌する。

- 実験精度を高く保つために、各サンプル 2 μ l 未満を使用しないでください。
- 96 個のサンプルを混合する場合は、必ず 1.5 ml チューブを

使用してください。

4. 混合されたライブラリー量の 80%相当量のビーズを添加する。
※ライブラリーを個別に精製する場合は、各 50 μ l のサンプルにビーズを 40 μ l 添加する。
5. 3~5 秒間ボルテックスまたは 10 回以上のピペッティングでしっかり攪拌する。
6. 室温で 5 分間インキュベートして、ライブラリーをビーズに結合させる。
7. サンプルを遠心機でクイックスピンのする。
8. サンプルを磁気分離装置上に 2 分間程度置き、上清が完全に透明になったことを確認する。
9. サンプルを磁気分離装置にセットした状態で、上清を取り除く。
10. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 μ l の 80%エタノールを添加する。
11. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。ライブラリーはビーズに結合したままである。
12. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 μ l の 80%エタノールを添加する。
13. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。
14. サンプルを遠心機でクイックスピンのする。
15. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。
16. ペレットの光沢がなくなり亀裂が入る直前まで、サンプルを室温で約 5~15 分間インキュベートする。
※ビーズの乾燥が進みペレットに亀裂が生じると、DNA がビーズから溶出されにくくなり、結果的に収量が低下する可能性があるため注意する。
17. サンプルを磁気分離装置から外し、表 7 を参考に必要な量の Nuclease-Free Water を加えて精製ライブラリーを溶出する。

表 7. 混合するライブラリー数に応じた Nuclease-Free Water 溶出量

Number of libraries pooled	Nuclease-Free Water
8	32 μ l
12	24 μ l
16	32 μ l
24	24 μ l
32	32 μ l
48	48 μ l
96	96 μ l

個別のライブラリーを精製する場合は、25 μ l の Nuclease-Free Water で溶出します。

- ピペッティングまたは穏やかなボルテックスでビーズをしっかり懸濁する。
- サンプルを室温で約 5 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。
- サンプルを磁気分離装置にセットして 2 分以上静置し、上清が透明になるまで待つ。
- 精製ライブラリーを含む透明な上清を、新しいチューブに移す。ビーズを持ち込まないように注意する。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを-20°Cで保管可能

増幅したライブラリーの収量確認

ライブラリーの収量確認は、Qubit dsDNA HS Assay や Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit などの蛍光検出ベースの方法で実施してください。シーケンシングライブラリーの定量には Library Quantification Kit (製品コード 638324) の使用を推奨します。

- ライブラリーの収量を測定する。

増幅したライブラリーの品質確認

【使用推奨機器・試薬】

- Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, 製品コード 5067-4626)

- High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, 製品コード 5067-5592)

各サンプルを約 3 ng/ μ l に希釈し、1 μ l の希釈液を用いて解析することを推奨する。

- ライブラリーの品質確認を実施する。

作製に成功したライブラリーは、図 2 の A (Bioanalyzer) や B (TapeStation) のような波形が確認される。

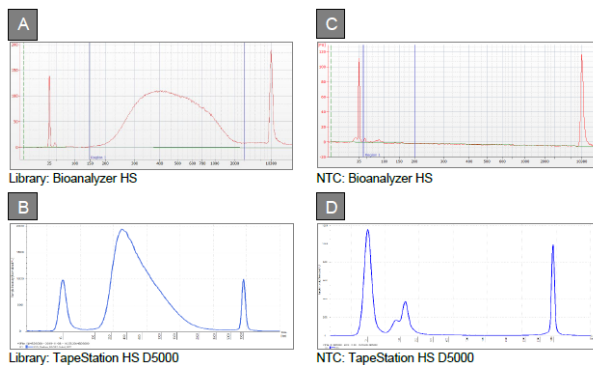


図 2. Bioanalyzer HS と TapeStation HSD5000 によるライブラリー解析結果の例

イルミナ NGS プラットフォームにロードする際は、使用する試薬ごとの "Denature and Dilute Libraries Guide" に従って操作してください。

本製品を購入する際の注意事項

この製品は研究用途のみに使用できます。ヒトへの使用、治療または診断を含む他の目的に使用することはできません。当社の製品を第三者に譲渡することや、再販、再販のための改造、商業製品の製造を行うには事前に当社から書面による承認を得る必要があります。また、製品 Web ページに記載の該当するライセンス要件についても遵守する必要があります。

タカラバイオ株式会社

製品に関するご質問は下記お問い合わせ先までご連絡ください。

テクニカルサポートライン

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