

## AllType+MiSeq 簡易プロトコル (日本語版 Draft)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。  
(Revision 1, 2018)

### **内容:**

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度
OLI-ALL-11XL	AllType NGS 11-Loci Amplification Kit	96 tests	冷凍 (-20℃)

### **必要な試薬:**

- 英語マニュアルを参照ください

### **1. 準備:**

- 英語マニュアルを参照ください

### **2. 操作方法:**

#### ■ Sample Amplification

- 1 次の試薬類を規定の温度に戻しておく  
室温：DNA, AllType Buffer, AllType dNTPs, AllType Primer Mix  
※AllType Buffer が濁っている場合は、37℃に温めて透明にする。  
氷上：AllType Polymerase (ボルテックス禁止)。

- 2 以下のように 96 well PCR plate に試薬類を分注する

<u>Class I • Class II</u>	1 sample	x ( )	
g DNA (25 ng/μL)	2.0 μL	-----	
AllType Buffer	4.0 μL		μL
AllType dNTPs	1.6 μL		μL
AllType Primer Mix	5.0 μL		μL
AllType Polymerase	0.8 μL		μL
Nuclease-Free Water	6.6 μL		μL
Total	20.0 μL	18 μL ずつ分注	

3. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

AllType		
94 °C	2 min	1 cycle
98 °C	10 sec	
69 °C	3 min	30 cycles
4 °C	∞	1 cycle

※モードは、9600 モード

<<Stop Point -30 ~ -10 °Cで1ヶ月保存可、-80 °Cで6ヶ月保存可>>

■ Purify the amplicons

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく
2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ( )
100 % EtOH	150 $\mu$ L	$\mu$ L
Nuclease-Free Water	50 $\mu$ L	$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>200 <math>\mu</math>L</b>	

3. 以下の様に Nunc 96 well plate に分注し、ピペッティングで混合する

AMPure XP Beads	12 $\mu$ L
Amplified product	20 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>32 <math>\mu</math>L</b>

4. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置
5. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)
6. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)
7. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾
8. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27  $\mu$ L 加え、ピペッティングで混合
9. 室温 1 分静置
10. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置
11. 上清 25  $\mu$ L を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10  $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80  $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

■ Amplicon Quantitation

1. Qubit の標準プロトコルに従い測定する  
(Working Solution 199  $\mu$ L + Sample 1  $\mu$ L で測定)
2. 設定は「dsDNA High Sensitivity」

■ Amplicon dilution

1. PCR 産物の数に従い、カリキュレーターに入力する
2. Conc のセルに濃度を入れる
3. カリキュレーターに従って混合し、100 ng / 35  $\mu$ L に調整する
4. 96 well PCR plate に調整済みのサンプルを分注する

<<Stop Point -30 ~ -10  $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80  $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

■ Amplicon Fragmentation

1. 以下のように 96 well PCR plate に試薬類を分注する

	1 sample	x ( )
PCR amplicons (100ng)	35 $\mu$ L	-----
Enzyme Mix II	9 $\mu$ L	$\mu$ L
10x Reaction Buffer	5 $\mu$ L	$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>49 <math>\mu</math>L</b>	<b>14 <math>\mu</math>L ずつ分注</b>

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

37 $^{\circ}$ C	6 min
70 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

■ **Adaptor ligation and nick repair**

1. 以下のように Fragmentation 終了後の 96 well PCR plate に試薬類を分注する

	1 sample	x ( )	
Fragmentation DNA	49 $\mu$ L	-----	
AllType Index	4 $\mu$ L	-----	
10x Ligase Buffer*	10 $\mu$ L		$\mu$ L
dNTP Mix*	2 $\mu$ L		$\mu$ L
DNA Ligase*	2 $\mu$ L		$\mu$ L
Nick Repair Polymerase*	8 $\mu$ L		$\mu$ L
Nuclease-Free Water	25 $\mu$ L		$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>	<b>47 <math>\mu</math>L ずつ分注</b>	

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

25 $^{\circ}$ C	15 min
72 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

■ **Size-Selection**

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく  
2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ( )	
100 % EtOH	150 $\mu$ L		$\mu$ L
Nuclease-Free Water	50 $\mu$ L		$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>200 <math>\mu</math>L</b>		

3. 1 枚目の Nunc 96 well Plate に以下の様に分注し、ピペッティングで混合する。

①Nunc 96 well plate

AMPure XP Beads	48.5 $\mu$ L
Ligated product	97.0 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>145.5 <math>\mu</math>L</b>

4. 室温 5 分→マグネットスタンドにセットし、3 分静置

5. 2 枚目の Nunc 96 well Plate に以下の様に分注し、ピペッティングで混合する。

②Nunc 96 well plate

AMPure XP Beads	14.6 $\mu$ L
①Nunc 96 well plate の上清	130.0 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>144.6 <math>\mu</math>L</b>

6. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置

7. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)

8. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)

9. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾

10. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27  $\mu$ L 加え、ピペッティングで混合

11. 室温 1 分静置

12. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置

13. 上清 25  $\mu$ L を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10  $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80  $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

## ■ Secondary Amplification

1. 以下のように、サンプルが入っている 96 well PCR plate に試薬を分注する

	1 sample	x ( )	
Size-selected sample	25.0 $\mu$ L	-----	
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	71.4 $\mu$ L		$\mu$ L
Library Amplification Primer Mix	3.6 $\mu$ L		$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>100.0 <math>\mu</math>L</b>		<b>75 <math>\mu</math>L ずつ分注</b>

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

95 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	15 sec	
58 $^{\circ}$ C	15 sec	8 cycles
70 $^{\circ}$ C	1 min	
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	1 cycle

## ■ Final Purification (グレー部分はダブルアンピュア)

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく
2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ( )	
100 % EtOH	150 $\mu$ L		$\mu$ L
Nuclease-Free Water	50 $\mu$ L		$\mu$ L
<b>Total</b>	<b>200 <math>\mu</math>L</b>		

3. 以下の様に 96 well PCR plate に分注し、ピペッティングで混合する。

AMPure XP Beads	100 $\mu$ L
Amplified product	100 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>200 <math>\mu</math>L</b>

4. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置

5. 上清を完全に除去する

6. Low TE を 50  $\mu$ L 加え、ピペッティングで混合

7. 室温 1 分静置

8. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置

9. 以下の様に新しい 96 well PCR plate に分注し、ピペッティングで混合する。

AMPure XP Beads	50 $\mu$ L
8 の上清	50 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>

10. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)

11. 上清を捨て、75 % EtOH を 100  $\mu$ L 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)

12. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾

13. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27  $\mu$ L 加え、ピペッティングで混合

14. 室温 1 分静置

15. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置

16. 上清 25  $\mu$ L を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10  $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80  $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

## ■ Final quantification and library pooling

サンプルは 5 倍希釈

High Sensitivity D1000 の標準プロトコル通りに測定

## ■ Library pooling

カリキュレーターに従い、混合する

<<Stop Point -20 °Cで希釈前は2ヶ月、希釈後は2週間保存可>>

## << Illumina MiSeq Sequencing >>

### ■ Sample Plate Creation

### ■ Sample Sheet Creation

Sample sheet は以下のとおり設定を行う。

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

FASTQ Only Run Settings

Reagent Cartridge Barcode\*

Library Prep Kit

Index Reads  0  1  2

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type  Paired End  Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

\* - required field

FASTQ Only Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Reverse Complement

Use Adapter Trimming

Use Adapter Trimming Read 2

### 注意事項

●

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3号館 5階  
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076  
技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)