



myBaits[®]

B; G

日本語ユーザーマニュアル
Version 5.03 June 2023

適用製品 myBaits Custom DNA-Seq
myBaits Custom RNA-Seq
myBaits Expert (**Wheat Exome および Human Affinities 以外**)

その他のマニュアルは arborbiosci.com/mybaits-manual からダウンロードできます

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。



© Daicel Arbor Biosciences
5840 Interface Drive, Suite 101
Ann Arbor, MI 48103 (USA)
+1 (734) 998-0751
info@arbor.daicel.com



公認代理店：

プライムテック株式会社 www.primetech.co.jp

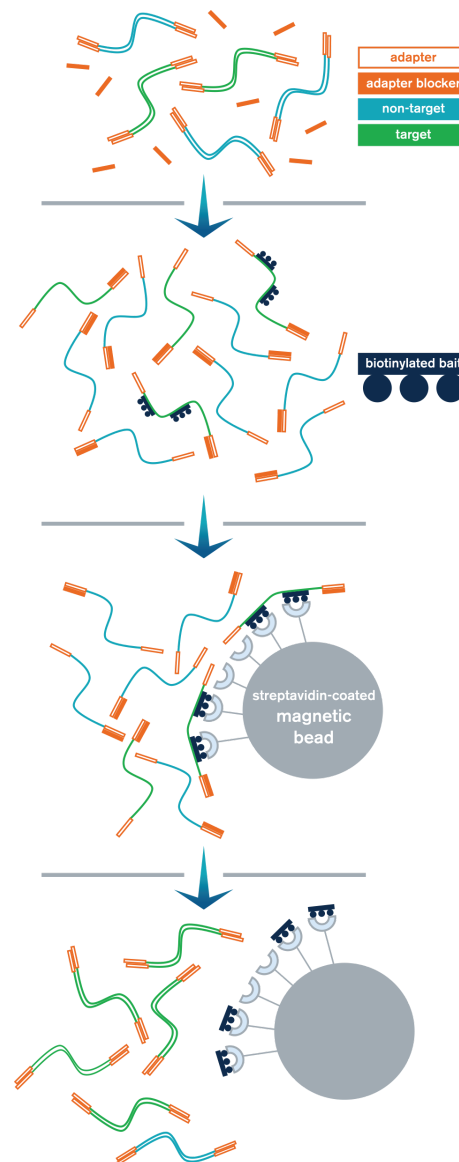
本 社：〒112-0002 東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone : (03)3816-0851 (代表) Fax.: (03)3814-5080 E-mail : reagents@primetech.co.jp

MYBAITS is a registered trademark of Biodiscovery, LLC dba Arbor Biosciences. DAICEL ARBOR BIOSCIENCES is a registered trademark of Daicel Corporation. ION TORRENT is a registered trademark of Life Technologies Corporation. DYNABEADS is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific. MYONE is a trademark of Thermo Fisher Scientific. NEXTERA, ILLUMINA, and TRUSEQ are registered trademarks of Illumina, Inc. KAPA is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. IDT and XGEN are registered trademarks of Integrated DNA Technologies, Inc. PACBIO is a registered trademark of Pacific Biosciences of California, Inc. OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES is a registered trademark of Oxford Nanopore Technologies, Ltd.

myBaits[®]は NGSライブラリーのためのターゲット濃縮システムです。Illumina[®]、Ion Torrent[®]、および直鎖状で、増幅ステップを含むどんなシーケンスライブラリーにも互換性があります。汎用の核酸合成技術を使用して、お客様のターゲット配列に相補的なビオチン化RNA「ベイト」を作成します。NGSターゲット濃縮用のベイトおよびその他の試薬は、myBaitsキットに付属しています。myBaitsで濃縮した後、ライブラリーを前述のプラットフォームでシーケンスするか、PacBio[®]またはOxford Nanopore Technologies[®]シーケンス用にさらに調製することができます。

手順の概要

1. 増幅したシーケンスライブラリー、アダプターブロッカー、その他のハイブリダイゼーション試薬を混合します。
2. ブロッカーをアダプターにハイブリダイズできるようにライブラリーを変性させます。その後、ベイトを加えて数時間かけターゲットにハイブリダイズさせます。
3. ベイトとターゲットのハイブリッドをストレプトアビジンコートされた磁気ビーズに結合させ、磁石で回収します。
4. ほとんどの非標的DNAが洗い流されます。キャプチャーされた細部ライブラリーを増幅し、直接シーケンスするか、さらに調整を行います。



このマニュアルと互換性のある Daicel Arbor Bioscience 製品

このマニュアルは、現在販売中のmyBaits Custom DNA-Seq、Custom RNA-SeqおよびExpert kitに対応していますが、Custom Methyl-Seq、Expert Wheat ExomeおよびExpert Human Affinities kitには対応していません。対応していない製品のマニュアルは、arborbiosci.com/mybaits-manualでダウンロードするか、reagents@primetech.co.jpにお問い合わせください。お客様のアプリケーションに適したマニュアルは4ページで確認することができます。

myBaitsマニュアル バージョン5.02以降の変更点

- 試薬キャップの色が変更されました（内容に変更はありません）。文章のマイナーチェンジを行いました。

myBaitsマニュアル バージョン4以降の変更点

- さまざまなアプリケーション用に3つの異なるmyBaitsプロトコルが含まれています（ページ4参照）。
- Block Aが**Block X**に代わり、特異性が改善されました。
- 精製後のビーズ再懸濁用に**Buffer E**が添付されました。

リピーターのお客様へ：バージョン4やそれ以前のキットに比べて、バージョン5の試薬はターゲット特異性（＝オンターゲットのリード率）が向上しています。

キットの内容と保存条件

Box	Reagent	Cap color		Volume per kit		
		Lot# 23XXXX	Lot# 22XXXX	8 Reaction	16 Reaction	48+ Reaction
Box #1 Store at 4°C	Hyb N	Red	Red	400 µL	400 µL	1000 µL
	Hyb S	Blue	Teal	1500 µL	1500 µL	1500 µL
	Beads	Clear	Clear	550 µL	550 µL	1600 µL
	Binding Buffer	Clear	Clear	12 mL	12 mL	36 mL
	Wash Buffer	Clear	Clear	20 mL	20 mL	60 mL
Box #2 Store at -20°C	Hyb D	Yellow	Yellow	140 µL	140 µL	400 µL
	Hyb R	Purple	Purple	50 µL	50 µL	150 µL
	Block C	Green	Dark Green	50 µL	50 µL	130 µL
	Block O	Blue	Blue	90 µL	90 µL	270 µL
	Block X	Orange	Orange	5 µL	9 µL	27 µL
	Buffer E	Clear	Light Green	550 µL	550 µL	1600 µL
Box #3 Store at -80°C	Baits	Clear	White	50 µL per 8 reactions		

myBaitsキットは常温で出荷され、輸送中も安定しています。キットボックスが到着後、上記の温度で保管された場合、試薬の有効期限は到着した日から1年間となります。

凍結融解サイクルを最小限に抑えるために、バイトを実験計画に適した反応サイズで分注して保存することを強く推奨します。

重要 実験前にお読みください

プロトコルの選択

このマニュアルには3つのmyBaitsプロトコルが含まれています。お客様のシーケンスライブラリーの特性により、下記のリストから適したプロトコルをお選びください。どのプロトコルを選ばよいか不明な場合は reagents@primetech.co.jp にお問い合わせください。

最適なプロトコルは実験ごとに異なりますが、これらはその最適なプロトコルに最短で辿り着くための基準となるプロトコルです。特定のベイトセットとライブラリーで濃縮するための最適のパラメーターを決定するには、試験と評価が必要になりますが、これらのプロトコルは、多くのベイトセットとライブラリーの組み合わせで機能しています。

スタンダード 5ページ～

ほとんどのターゲットシーケンスアプリケーション

濃縮するNGSライブラリーが以下の条件の場合

- 高品質のgDNAでライブラリーを作成し、ターゲットインサート長が80 - 1,000 bpである
- ターゲット配列のGC含量の平均が25%以上である
- ターゲットゲノムの割合が50%以上である
- 広範囲にわたって塩基置換（例、脱アミノ化やバイサルファイト置換）がない

高感度 17ページ～

高度に汚染されたサンプル、古代DNA、ベイトとターゲット配列がかなり異なる、あるいはターゲット配列が短い

濃縮するNGSライブラリーが以下のいずれかの条件にあてはまる場合

- 外生DNAが高度に含まれている（例、宿主DNA中の病原体がターゲットの場合、古代DNA、環境DNA）
- ターゲット配列のほとんどが80 bp以下である
- ターゲット配列のGC含量の平均が25%以下である
- ターゲット配列がベイト配列と平均で25%以上異なっている

ロングインサート 29ページ～

インサートの長さが1-10 kbのNGSライブラリー

濃縮するNGSライブラリーが以下の条件の場合

- ほとんどのインサートが1,000 bp以上であり、
- プラットフォーム特異的なライブラリー調製（例、PacBioやNanopore用のライブラリー調製）の前にユニバーサルアダプタープライマーで増幅できる場合



スタンダードプロトコル

ほとんどのシーケンスアプリケーション

目次

必要条件と推奨事項	
ライブラリーのインプット	6
ブロッキングオリゴ	6
キット以外に必要な機器・消耗品・試薬	7
手順 パート1：ハイブリダイゼーションのセットアップ	
S1.1 ハイブリダイズ温度の選択	8
S1.2 必要な試薬と機器・消耗品	8
S1.3 ハイブリダイゼーションミックスの調製	9
S1.4 ブロッカーミックスの調製	9
S1.5 反応	10
手順 パート2：結合と洗浄	
S2.1 洗浄温度の選択	11
S2.2 必要な試薬と機器・消耗品	11
S2.3 Wash Buffer Xの調製	11
S2.4 ビーズの準備	12
S2.5 ビーズとハイブリッドの結合	12
S2.6 ビーズの洗浄	12
手順 パート3：ライブラリーの再懸濁と増幅	
S3.1 必要な試薬と機器・消耗品	13
S3.2 濃縮したライブラリーの回収	13
S3.3 ライブラリーの増幅	13
付録	
SA1 トラブルシューティング	15
SA2 myBaitsスタンダードプロトコルクイックガイド	16

myBaitsはPCRで増幅した、あるいは増幅可能なNGSライブラリーに用いることができます（例、Illumina TruSeq®シリーズ、Illumina Nextera® Flexシリーズ、Ion Torrentやその他のユニバーサルアダプタープライミングサイトのあるライブラリー）。myBaitsをPCRフリーのライブラリーに用いることは推奨しません。さらに、myBaitsはオリジナルのNexteraあるいはNextera XTライブラリー調製キットで調製したライブラリーや、ビオチンを含むライブラリーには互換性がありません。PCRがジャンプしてしまうことによるミスインデックスの危険性を減少させるため、ライブラリーのデュアルインデックス化を強く推奨します。

myBaitsのターゲット濃縮反応には、トータルで7 μ lのNGSライブラリーを加えられます。多くの場合、ライブラリーをプールするには真空遠心分離や他の手段でライブラリーを濃縮する必要があります。このステップはmyBaitsの実験を始める前に行ってください。ライブラリーはヌクレアーゼフリーのバッファーか水に懸濁してください。

myBaitsはナノグラムからマイクログラムまで、幅広い質量のライブラリーを濃縮することができます。しかし、100 ngかそれ以上の量で濃縮反応を行うと、最も良い結果が得られます。ライブラリー量の計測には染色アッセイや電気泳動でなく、qPCRを用いることを強く推奨します。ライブラリーのプールを行う際の推奨量は下をご参照ください。

最適なプールパラメーター（ライブラリーの数とライブラリー総質量の両方の観点から）はライブラリーのタイプとバインドセットにより変わり、決定するには試行が必要ですが、多くの構成ではうまく機能するはずですが、プールされたサンプル間のキャプチャパフォーマンスのばらつきを最小限に抑えるために、予想されるバインドとゲノム配列の同一性（分類群）、DNA品質、開始DNA量、ライブラリーインサートの長さ、および相対的なターゲットゲノム量とバックグラウンドに基づいて、同等なライブラリーのみをプールします。それぞれのライブラリーは同量ずつプールしてください。ゲノムサイズが5 Gb以下の生物種から調製されたライブラリーは1反応あたり8ライブラリーを1ライブラリーを250 ngずつ、計2 μ gプールすることを推奨します。ゲノムサイズが5 Gb以上の場合、1反応あたり8ライブラリーを1ライブラリーを1 μ gずつ、計8 μ gプールすることを推奨します。

myBaitsキットをご注文の際は、濃縮するライブラリーの構成をお知らせください。キットに標準で添付するアダプターブロック試薬（6`cW`L）はIllumina TruSeqシリーズかNexteraシリーズを用いて、シングルで6-12 bp、あるいはデュアルで6-12 bpのインデックス化を行ったライブラリーに対応しています。Ion TorrentフォーマットではBlock Aが添付します。その他のアダプター構成では、お客様のNGSライブラリーのアダプター配列用にCustom IDT® xGen® Blocking Oligoを注文することを推奨します。myBaitsキットのBlock Xの代わりに、1 μ g/ mLの濃度でどのカスタムアダプターブロックオリゴでも使用することができます。

Item	Notes
50 mL tubes	1 per 44 reactions
Microcentrifuge tubes (1.5, 1.7, or 1.8 mL)	2 per 8 reactions
0.2 mL PCR strips with attached lids	2 per 8 reactions (e.g., VWR Cat# 93001-118)
Pipettors and tips for 0.5 - 500 μ L	Multichannel for 20 and 500 μL recommended
† Thermal cycler with heated lid compatible with 0.2 mL strips	1 or 2
Magnetic particle collector for microcentrifuge tubes	1 (e.g., ThermoFisher Cat# 12321D)
Magnetic particle collector for 0.2 mL strips	1 (e.g., Permagen Cat# S500)
Vortex mixer and mini-centrifuge for tubes and strips	
Water bath or incubation oven at 65°C	
Heat block for microcentrifuge tubes at 60°C	

† 使用するサーマルサイクラーとPCRストリップチューブで、65°Cオーバーナイトの反応で、30 μ Lの反応液の蒸発量が4 μ L以下であることを確認してください。

キット以外に必要な試薬

Reagent	Notes
Nuclease-free ("NF") water	900 μ L per reaction
PCR primers to amplify sequencing libraries after capture, e.g.:	
Illumina P5: AATGATACGGCGACCACCGA	2.5 μ L @ 10 μ M per reaction
Illumina P7: CAAGCAGAAGACGGCATA CGA	2.5 μ L @ 10 μ M per reaction
PCR reagents for post-capture amplification	1 per reaction (e.g. Roche Cat# 07958927001)
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	1 cleanup per reaction

手順

%:

シーケンスライブラリーをさまざまなブロッキングオリゴと混合し、変性し、その後ベイトを含むその他のハイブリダイゼーション試薬と混合します。これらのハイブリダイゼーション反応液を数時間インキュベートし、ベイトが標的ライブラリー分子とハイブリダイズできるようにします。

S1.1

62°C

65°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10%以下と予想される場合

62°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10-15%と予想される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-25%と予想される場合

Reagents

Reagents
Hyb N and Hyb S from Box 1
Hyb D and Hyb R from Box 2
Block C, Block O, and Block X from Box 2
Baits from Box 3 KEEP ON ICE
Libraries or library pools in 7 µL per reaction

Equipment

Equipment
Nuclease-free microcentrifuge tubes (x2)
0.2 mL strips with attached lids (x1 per 8 reactions)
Pipettors and tips; multichannel for 20 µL recommended
Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
Heat block set to 60°C
Thermal cycler(s); 2 blocks recommended for 24 or more reactions

サーマルサイクラーのプログラム:



蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10°C高く設定してください。

Step	Temperature	Time
1	95°C	5m
2	T _H	5m
3	T _H	∞

G%

1. Hyb試薬を融解し、ボルテックスで混合し、スピンドウンします。



Hyb NとHyb Sに融解後沈殿物がある場合、60℃で加熱し、沈殿物が溶解するまでボルテックスで混合してください。

2. マイクロ遠心(MC)チューブでハイブリダイゼーションミックスを調製し、短時間ボルテックスで混合し、スピンドウンします。下記はピペティングエラーを考慮した容量です。

Component	μL / Reaction
Hyb N	9.25
Hyb D	3.5
Hyb S*	0.5
Hyb R	1.25
Baits	5.5
TOTAL	20

* Hyb Sを加えると濁りますが、ステップ3でクリアになります。

3. ハイブリダイゼーションミックスを60℃のヒートブロックで10分インキュベートします。チューブ内に付着する凝縮物を回収するために時々ボルテックスで混合します。ヒートブロックから取り出し、5分間室温で静置します。
4. キャプチャー反応ごとに、18.5 μLのハイブリダイゼーションミックスを0.2 mLチューブに分注します。

この分注したハイブリダイゼーションミックスを“HYBs”とします

S1.4 ブロッカーミックスの調製

1. 下記の表に基づき、ターゲット種に応じたブロッカーミックスを適切なチューブに加え、ピペティングで混合します。下記はピペティングエラーを考慮した容量です。


MOST TAXA		PLANTS		SALMONIDS	
Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction
Block O	2.5	Block O	5.0	Block O	-
Block C	2.5	Block C	-	Block C	2.5
Block X	0.5	Block X	0.5	Block X	0.5
NF Water	-	NF Water	-	NF Water	2.5
TOTAL	5.5	TOTAL	5.5	TOTAL	5.5

2. キャプチャー反応ごとに、5 μLのブロッカーミックスを0.2 mLチューブに分注します。
3. 7 μL の一つのあるいはプールしたライブラリーをそれぞれブロッカーミックスに加え、ピペティングで混合します。


このライブラリーとアダプターブロッカーミックスの混合物を“LIBs”とします

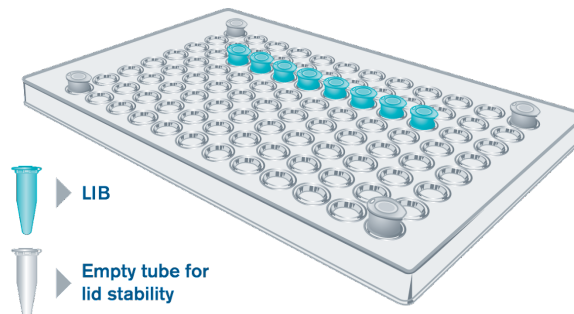
G%)


ダブルチェックをしてください：

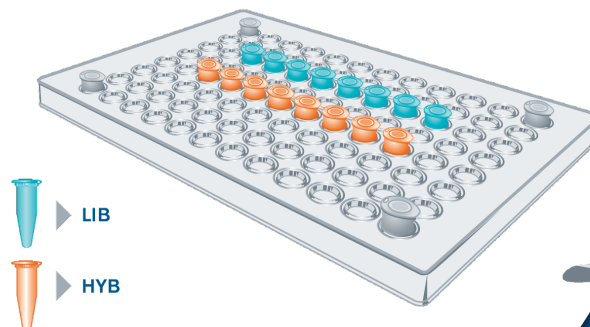
 蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10℃高く設定してください



Step	Temperature	Time
1	95°C	5m
2	T _H	5m
3	T _H	∞

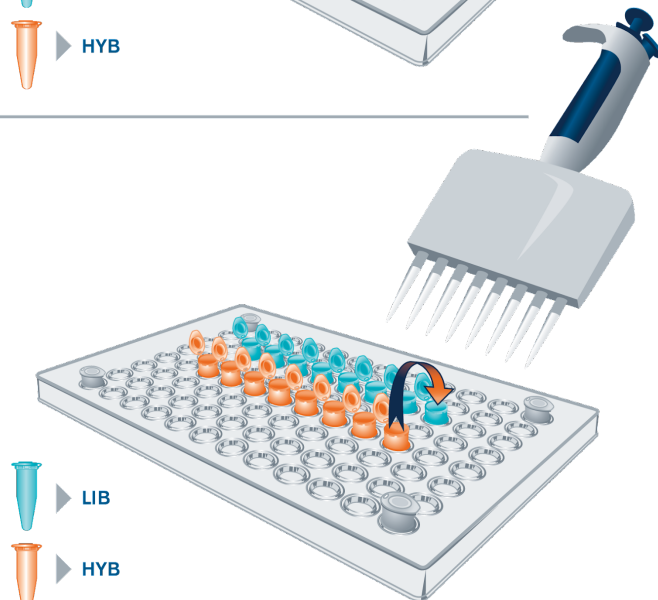
1. サーマルサイクラーに  チューブをセットし、蓋を閉じて、温度プログラムを開始します。





2. サーマルサイクラーがステップ 2 のハイブリダイズ温度に達したら、プログラムを一時停止します。サーマルサイクラーに  チューブをセットし、蓋を閉じて、プログラムを再開します。



3. プログラムのステップ 2 が完了したら、すべてのチューブをサーマルサイクラーに残したまま、 %`»@  マルチチャンネルピペッターを使用すると、簡単に作業できます。5 回ピペティングして穏やかに混合します。



4.  チューブを廃棄します。 チューブを短時間スピンドウンした後、サーマルサイクラーに戻し、蓋を開けてオーバーナイト（16-24 時間）でインキュベートしハイブリダイズさせます。

パート2：結合と洗浄（クリーンナップ）

ベイトとターゲットのハイブリッドをストレプトアビジンでコートされた磁気ビーズと結合させます。続いて、温めたバッファーで数回洗浄し、ほとんどの非ターゲットDNAを除去します。この操作は通常、パート1完了の翌日に行います。

S2.1 洗浄温度(T_w)の選択(通常 T_H と同じ)

65°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10%以下と予想される場合

62°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10-15%と予想される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-25%と予想される場合

G&A



ハイブリダイゼーションを止める少なくとも90分前に開始してください。

Reagents

Hyb S (Box 1) *

Binding Buffer (Box 1) *

Wash Buffer (Box 1) *

Beads (Box 1)

Nuclease-free (NF) Water (up to 900 μ L per reaction)

† すべての試薬を室温にしておいてください。沈殿物がある場合、60°Cで加熱し、沈殿物が溶解するまでボルトックスで混合してください。

Equipment

Water bath or incubation oven set to the T_w (e.g., 65°C)

Receptacles for 50 mL tubes, 0.2 mL strips and microcentrifuge tubes compatible with above incubation device

Vortex mixer and mini-centrifuge for 0.2 mL strips and MC tubes

Magnetic particle collector(s) (MPC) for above strips and/or tubes

When using only a microcentrifuge (MC) tube-compatible MPC

Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 44 cleanups

Nuclease-free MC tubes, 1 per reaction

Heat block set to the T_w

Pipettors and tips for 20 – 500 μ L

When using a 0.2 mL tube-compatible MPC

Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 68 cleanups

Nuclease-free 0.2 mL PCR strips with individually-attached lids, 1 vessel per reaction

Thermal cycler set to T_w

Pipettors and tips for 20 – 200 μ L;

multichannel pipettor strongly recommended

G&M K Ugl'6i ZYf'L

このステップは、マイクロ遠心（MC）チューブでの44反応の洗浄フォーマットに、0.2 mLチューブでの68反応の洗浄フォーマットに十分なWash Buffer Xを作成します。必要に応じて作成量を調整してください。

1. Wash BufferとHyb Sを、それぞれ沈殿物を溶解させ完全に混合します。必要に応じて短時間温めます。
2. 400 μ LのHyb Sと39.6 mLのNF水、および10 mLのWash Bufferを50 mLチューブに入れます。ボルテックスで完全に混合し、“Wash Buffer X”とラベルをつけておきます。

Wash Buffer Xは4°Cで1か月間保存できます。

3. 少なくとも使用前の30分間、ウォーターバスかインキュベーションオーブンでWash Buffer Xを洗浄温度（ T_w ）で加熱します。

S2.4 ビーズの準備 ビーズは使用直前に十分懸濁してください

1. MCチューブにキャプチャー反応ごとに30 μ Lのビーズ溶液を入れます。
2. MPCにチューブをセットし、ビーズがペレットとなり、溶液が透明になるまで静置します（1-2分）。チューブをMPCに置いたまま上清を除去し廃棄します。
3. 200 μ LのBinding Bufferをビーズペレットに加え。ボルテックスでビーズを再懸濁し、スピンドウンします。MPCにチューブをセットし、ビーズをペレット化させます。上清を除去し廃棄します。
4. 3.の工程を2回繰り返し、合計3回洗浄します。
5. 洗浄したビーズを70 μ LのBinding Bufferで再懸濁します。0.2 mLフォーマットで洗浄する場合は、PCRストリップチューブに再懸濁液を移します。

ヒント：ビーズはMCチューブを利用して、8（以下）の反応数（最大240 μ L）で調製できます。MCチューブ1本ですべての反応数分の試薬を調製します。すなわち8反応分の場合、1.6 mLのBinding bufferで洗浄し、560 μ LのBinding Bufferで再懸濁し、70 μ Lの懸濁液を個々のチューブに分注します。

S2.5 ビーズとハイブリッドの結合

1. ビーズ溶液を T_w で少なくとも2分間加熱します。
2. 各キャプチャー反応物（S1.5-4）を加熱したビーズ溶液に加え、ピペティングで混合します。
3. ライブラリーとビーズの混合物（S2.5-2）をヒートブロックかサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。ビーズを攪拌された状態に保つために、2.5分経過したらチューブをフリックあるいは反転させ、その後短時間スピンドウンします。

S2.6 ビーズの洗浄

1. 溶液が透明になるまで、MPCでビーズをペレット化します。上清を除去し廃棄します。
TIP: この上清は、同じあるいは異なるバイトで再キャプチャーするためのバックアップとして保存することができます。
2. 加熱した375 μ L（MCチューブフォーマット）あるいは180 μ L（0.2 mLチューブフォーマット）のWashing Buffer Xをビーズに加え、MPCから取り出し、ヒートブロックに15秒置いたのち、短時間のボルテックスあるいはピペティングにより混合します。チューブを短時間スピンドウンします。
3. T_w のヒートブロックあるいはサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。2.5分経過したら軽くボルテックスすることによって攪拌し、短時間スピンドウンします。
4. 1.から3.の工程をMCチューブフォーマットでは2回（合計3回）、0.2 mLチューブフォーマットでは3回（合計4回）繰り返します。**最後の洗浄が終了したら、ビーズペレットには触れずに可能な限り溶液を取り除きます。**

パート3: ライブラリーの再懸濁と増幅

ビーズに結合した濃縮ライブラリーをBuffer Eに懸濁し、増幅します。

S3.1 必要な試薬と機器・消耗品

Reagents	Equipment
Buffer E (Box 2)	Tubes appropriate for PCR master mix assembly
PCR primers for amplifying libraries (e.g., P5 and P7)	Tubes or strips for 50 µL PCR amplification
PCR reagents for post-capture amplification	Pipettors and tips capable of 5 – 100 µL volumes
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
Nuclease-free (NF) Water	Thermal cycler

S3.2 濃縮したライブラリーの回収

1. 洗浄したビーズ (S2.6-4) に30 µLのBuffer Eを加え、ピペッティングにより完全に再懸濁します。次のステップは、お客様の用いるライブラリー増幅試薬により、下記のワークフローAあるいはBを選択してください。

ワークフローA : KAPA HiFi HotStart あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase を使用する場合

- 2A. このビーズ懸濁液を増幅のテンプレートとして、直接S3.3 に進んでください。

ワークフローB : ワークフローA 以外のポリメラーゼシステムを使用する場合

- 2B. ビーズ懸濁液を 95°Cで 5 分間インキュベートします。
- 3B. すぐに MPC でビーズをペレット化し、エンリッチされたライブラリーを含む上清を回収します。

S3.3 ライブラリーの増幅

下記はKAPA HiFi HotStart Ready MixおよびIlluminaのライブラリーで、キャプチャー後の増幅を行った例です。

1. 下記の PCR 反応液を準備します

Component	Final Concentration	µL / Reaction	Sequence
NF Water	-	5	-
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	1 X	25	-
P5 library primer (at 10 µM)	500 nM	2.5	AATGATACGGCGACCACCGA
P7 library primer (at 10 µM)	500 nM	2.5	CAAGCAGAAGACGGCATACGA
Enriched Library (on- or off-bead)	-	15 *	-
TOTAL		50	-

* 残りのビーズに結合したライブラリーは-20°Cで数か月保存できます。

S3.3 ライブラリーの増幅（続き）

2. 以下のプログラムで反応を行います。

Step	Temperature	Time
1	98°C	2 minutes
2	98°C	20 seconds
3	60°C	30 seconds
4	72°C	45 seconds
5	72°C	5 minutes
6	8°C	∞

×8 to 14
cycles*

*最低限のサイクルで行ってください。シーケンスプラットフォームによっては、必要なモル濃度を満たすに14サイクル以上になる可能性があります。

3. 増幅後、精製を行ってください。

- 反応溶液にビーズが含まれており、シリカカラムを用いて精製する場合、ビーズをペレット化したのちに上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。
- 上記以外の場合、いずれかのPCR精製システム（シリカカラムやSPRIビーズなど）を使用して反応溶液を精製します。

これで、ライブラリーの濃縮は完了です。定量、品質チェックを行い、シーケンシングを行えます。

付録

SA1: トラブルシューティング

ハイブリダイゼーション中にサーマルサイクラーの温度がハイブリダイズ温度より下がってしまいました。

完全に濃縮が失敗するわけではありませんが、温度が維持された場合に比べてオンターゲットのリード率とターゲットのリードの複雑さが下がることが予測されます。予備試験として浅くシーケンシングすることで、ターゲットが十分なカバレッジを得られるかどうか判断できます。

濃縮し、増幅したライブラリーが電気泳動（あるいは同様の装置）で観察できません

キャプチャーに成功したライブラリーは再増幅した後も全量が数ngであることが多く、この量は電気泳動では観察することができません。これは特にターゲットが小さいか（100 bp以下）、出発材料中でのターゲットDNAの割合が低い（例、分解・古代・環境DNA）、キャプチャー後のライブラリーの再増幅が少なかった場合に一般的にみられます。多くの場合、ライブラリー増幅をさらに数サイクル行くと、電気泳動で十分観察される濃度になります。あるいは、ライブラリーがシーケンスに十分な量かどうかをqPCRで定量することができます。PCRのプラトーに達する前にサイクルを止めた場合、電気泳動でqPCR産物の長さの分布を観察することができます。ライブラリーの濃度と量については、シーケンスプロバイダーにご相談ください。

濃縮し、増幅したライブラリーが元のライブラリーよりかなり長い、ピークが二つあります。

これは、ライブラリーが増幅されすぎたことで、テンプレートの伸長なしに変性-再生が起こり'daisy-chains'あるいは'bubbles'と呼ばれる構造を形成した場合に起こります。これは通常のライブラリー増幅法でPCRを3サイクル行うことで元のライブラリーの状態に戻すことができます。

濃縮したライブラリーのシーケンスデータで、PCR重複が高い確率で見られました

シーケンスデータ中の重複率（つまり"clonalityあるいは"duplication rate"）は深く読むほど増加し、実験前にシーケンス深度が適正化されている場合のみ実験間で正しく比較できます。得られた生シーケンスリードをX軸に、ユニークリードをY軸にしてプロットすることで、ライブラリーがオーバーシーケンスされたかどうかを評価することができます。この'**complexity curve**'がプラトーに達しているが、十分なユニークリードを得られている場合、必要以上に深くシーケンスされたと考えられます。プロットが平らにならなかった場合、あるいはライブラリーの潜在的なユニークリードの収量を増やしたい場合、**ライブラリー調製に用いるDNAの量を増やす、あるいはキャプチャー反応あたりのライブラリー量を増やしてください。キャプチャー前にベイトを希釈しないでください。**重度に汚染または損傷したDNAをターゲットとして用いる場合、キャプチャーの感度を改善するためにすべてのステップで温度を下げることを検討してください。可能な場合、PCRサイクルを減らすことで、得られたシーケンス深度でのターゲットのカバレッジの均一性と複雑さを改善できる可能性があり、いくつかのケースでは重複率に非直接的な効果がある場合があります。NGSアプリケーションにおけるライブラリーの複雑さについてはDaley & Smith 2013 (doi: 10.1038/nmeth.2375)に情報が 있습니다。

SA2: myBaitsスタンダードプロトコルクイックガイド

1. 反応ごとに、下記の試薬を調製します（ピペットエラーは調整済みです）

Hybridization Mix	
Component	μL / Reaction
Hyb N	9.25
Hyb D	3.5
Hyb S	0.5
Hyb R	1.25
Baits	5.5
TOTAL	20

Blockers Mix	
Component	μL / Reaction
Block X	0.5
Block C	2.5 [†]
Block O	2.5*
NF Water	0 [†]
TOTAL	5.5

[†] Plants: 0; Salmonids: 2.5

*Plants: 5.0; Salmonids: 0

2. ハイブリダイゼーションミックスを 60°C で 10 分間加熱したのち、1 反応あたり 18.5 μL のハイブリダイゼーションミックスをそれぞれのチューブに分注します（“HYBs”）。
3. 反応ごとに、5 μL のブロッカーミックスを分注し、7 μL のライブラリーを混合します（＝“LIBs”）。
4. 95°C のサーマルサイクラーで LIBs を 5 分間インキュベートし、ハイブリダイズ温度に下げます。ヒートリッドにしてください。
5. HYBs をサーマルサイクラーにセットし、ハイブリダイズ温度で 5 分間加熱します。
6. 18 μL の HYB をそれぞれの LIB に加えてピペティングで混合し、16-24 時間インキュベートします。
7. 9.を行う 1.5 時間前に 400 μL の HybS と 39.6 mL のヌクレアーゼフリー水と 10 mL の Wash Buffer を 50 mL チューブで混合し、Wash Buffer X を作成します。ボルテックスで完全に混合し、ハイブリダイズ温度で少なくとも 45 分間加熱します。
8. 1 反応あたり 30 μL のビーズを 200 μL の Binding Buffer で 3 回洗浄し準備しておきます。70 μL の Binding Buffer でビーズを再懸濁し、少なくとも 2 分間ハイブリダイズ温度で加熱します。
9. 加熱したビーズとハイブリダイズ反応物を混合し、ハイブリダイズ温度で 5 分間インキュベートします。2.5 分経過したら懸濁します。
10. ビーズをペレット化し、上清を除去します。洗浄にマイクロ遠心チューブを使用する場合、375 μL の加熱した Wash Buffer X で 3 回洗浄し、ハイブリダイズ温度で 5 分インキュベートします。0.2 mL チューブを使用する場合 180 μL で 4 回洗浄します。
11. 30 μL の Buffer E でビーズを再懸濁し、このうち 15 μL を KAPA[®] HiFi あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase システムでの 50 μL の系で増幅反応に使用します。その他のポリメラーゼシステムを使用する場合、ビーズ懸濁液を 95°C で 5 分間インキュベートし、すぐにビーズをペレット化し、15 μL の上清を 50 μL の系で増幅反応に使用します。
12. 増幅反応物をシリカカラムか SPRI ビーズで精製します。ビーズが増幅反応物に含まれていた場合、ビーズをペレット化し、上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。



高感度プロトコル

高度に汚染されたサンプル、古代DNA、バイトとターゲット配列がかなり異なる、あるいはターゲット配列が短い

目次

必要条件と推奨事項

ライブラリーのインプット	18
ブロッキングオリゴ	18
二回濃縮プロトコルに関する特記事項	19
キット以外に必要な機器・消耗品・試薬	19

手順 パート1：ハイブリダイゼーション

H1.1 ハイブリダイズ温度の選択	20
H1.2 必要な試薬と機器・消耗品	20
H1.3 ハイブリダイゼーションミックスの調製	20
H1.4 ブロッカーミックスの調製	21
H1.5 反応	22

手順 パート2：結合と洗浄

H2.1 洗浄温度の選択	23
H2.2 必要な試薬と機器・消耗品	23
H2.3 Wash Buffer Xの調製	23
H2.4 ビーズの準備	24
H2.5 ビーズとハイブリッドの結合	24
H2.6 ビーズの洗浄	24

手順 パート3：ライブラリーの再懸濁と増幅

H3.1 必要な試薬と機器・消耗品	25
H3.2 濃縮したライブラリーの回収	25
H3.3 ライブラリーの増幅	25
H3.4 2回目の濃縮	26

付録

HA1 トラブルシューティング	27
HA2 myBaits高感度プロトコルクイックガイド	28

必要条件と推奨事項

ライブラリーのインプット

ライブラリー形式 myBaitsはPCRで増幅した、あるいは増幅可能なNGSライブラリーに用いることができます（例、Illumina TrueSeq®シリーズ、Illumina Nextera® Flexシリーズ、Ion Torrentやその他のユニバーサルアダプタープライミングサイトのあるライブラリー）。myBaitsをPCRフリーのライブラリーに用いることは推奨しません。さらに、myBaitsはオリジナルのNexteraあるいはNextera XTライブラリー調製キットで調製したライブラリーや、ビオチンを含むライブラリーには互換性がありません。PCRがジャンプしてしまうことによるミスインデックスの危険性を減少させるため、ライブラリーのデュアルインデックス化を強く推奨します。

容量 myBaitsのターゲット濃縮反応には、トータルで7 µlのNGSライブラリーを加えられます。多くの場合、ライブラリーをプールするには真空遠心分離や他の手段でライブラリーを濃縮する必要があります。このステップはmyBaitsの実験を始める前に行ってください。ライブラリーはヌクレアーゼフリーのバッファーク水に懸濁してください。

質量とプール myBaitsはナノグラムからマイクログラムまで、幅広い質量のライブラリーを濃縮することができます。最適なプールパラメーター（ライブラリーの数とライブラリー総質量の両方の観点から）はライブラリーのタイプとバイトセットにより変わり、決定するには試行が必要ですが、多くの構成ではうまく機能するはずですが。

分解しておらず、汚染のないDNAライブラリー（例、バイトとターゲット配列が25%以上異なる）：
プールされたサンプル間のキャプチャパフォーマンスのばらつきを最小限に抑えるために、予想されるバイトとゲノム配列の同一性（分類群）、DNA品質、開始DNA量、ライブラリーインサートの長さ、および相対的なターゲットゲノム量とバックグラウンドに基づいて、同等なライブラリーのみをプールします。それぞれのライブラリーは同量ずつプールしてください。ゲノムサイズが5 Gb以下の生物種から調製されたライブラリーは1反応あたり8ライブラリーを1ライブラリー250 ngずつ、計2 µgプールすることを推奨します。ゲノムサイズが5 Gb以上の場合、1反応あたり8ライブラリーを1ライブラリー1 µgずつ、計8 µgプールすることを推奨します。

分解しており、汚染されたDNAライブラリー：可能な限り1反応あたりのライブラリーの数を少数にとどめ、キャプチャーはトータル12 µgまで可能な限り最大量のライブラリーをインプットしてください。プールする必要がある場合、各ライブラリーに含まれるターゲット量が同じになるように、ライブラリーの内生含量がバランスが取れていることを確認してください。例えば、2つのライブラリーをプールする際、ライブラリーAには20%の内生テンプレートが含まれており、ライブラリーBには10%だった場合、ライブラリーBをライブラリーAの二倍量用いてプールしてください。

ブロッキングオリゴ

myBaitsキットをご注文の際は、濃縮するライブラリーの構成をお知らせください。キットに標準で添付するアダプターブロッキング試薬（Block X）はIllumina TruSeqシリーズかNexteraシリーズを用いて、シングルで6-12 bp、あるいはデュアルで6-12 bpのインデックス化を行ったライブラリーに対応しています。Ion TorrentフォーマットではBlock Aが添付します。その他のアダプター構成では、お客様のNGSライブラリーのアダプター配列用にCustom IDT®

xGen® Blocking Oligoを注文することを推奨します。myBaitsキットのBlock Xの代わりに、1 µg/ mLの濃度でどのカスタムアダプターブロッキングオリゴでも使用することができます。

二回濃縮プロトコルに関する特記事項:

高感度プロトコルでは二回の濃縮を行います。添付の試薬では足りなくなる可能性があるため、ベイトを含まないmyBaits試薬の購入が必要です。例えば、16反応すべてを高感度プロトコルで行った場合、追加で16反応分のmyBaits試薬が必要となります。myBaits試薬は16（カタログ番号300016.v5）あるいは48反応分（300048.v5）をご用意しております。

キット以外に必要な機器・消耗品

Item	Notes
50 mL tubes	1 per 44 reactions
Microcentrifuge tubes (1.5, 1.7, or 1.8 mL)	2 per 8 reactions
0.2 mL PCR strips with attached lids	2 per 8 reactions (e.g., VWR Cat# 93001-118)
Pipettors and tips for 0.5 - 500 µL	Multichannel for 20 and 500 µL recommended
† Thermal cycler with heated lid compatible with 0.2 mL strips	1 or 2
Magnetic particle collector for microcentrifuge tubes	1 (e.g., ThermoFisher Cat# 12321D)
Magnetic particle collector for 0.2 mL strips	1 (e.g., Permagen Cat# S500)
Vortex mixer and mini-centrifuge for tubes and strips	
Water bath or incubation oven at 65°C	
Heat block for microcentrifuge tubes at 60°C	

† 使用するサーマルサイクラーとPCRストリップチューブで、65°Cオーバーナイトの反応で、30 µLの反応液の蒸発量が4 µL以下であることを確認してください。

キット以外に必要な試薬

Reagent	Notes
Nuclease-free ("NF") water	900 µL per reaction
PCR primers to amplify sequencing libraries after capture, e.g.:	
Illumina P5: AATGATACGGCGACCACCGA	2.5 uL @ 10 µM per reaction
Illumina P7: CAAGCAGAAGACGGCATA CGA	2.5 uL @ 10 µM per reaction
PCR reagents for post-capture amplification	1 per reaction (e.g. Roche Cat# 07958927001)
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	1 cleanup per reaction

手順

パート1：ハイブリダイゼーションのセットアップ

シーケンスライブラリーをさまざまなブロッキングオリゴと混合し、変性し、その後ベイトを含むその他のハイブリダイゼーション試薬と混合します。これらのハイブリダイゼーション反応液を数時間インキュベートし、ベイトが標的ライブラリー分子とハイブリダイズできるようにします。

H1.1 ハイブリダイズ温度(T_H)の選択

63°C

DNAライブラリーのGC含量が低い、あるいはベイトとターゲットで配列の違いが15%以下と予測される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-20%と予想される場合

55°C

ライブラリーのインサートの長さがmyBaitsプローブの長さより短いものがほとんどである、あるいはベイトとターゲットで配列の違いが25%以上と予想される場合

H1.2 必要な試薬と機器・消耗品

Reagents	Equipment
Nuclease-free Water ("H ₂ O")	Nuclease-free microcentrifuge tubes (×2)
Hyb N and Hyb S from Box 1	0.2 mL strips with attached lids (×1 per 8 reactions)
Hyb D and Hyb R from Box 2	Pipettors and tips; multichannel for 20 µL recommended
Block C, Block O, and Block X from Box 2	Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
Baits from Box 3 KEEP ON ICE	Heat block set to 60°C
Libraries or library pools in 7 µL per reaction	Thermal cycler(s); 2 blocks recommended for 24 or more reactions

サーマルサイクラーのプログラム:



蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10°C高く設定してください。

Step	Temperature	Time
1	95°C	5m
2	T_H	5m
3	T_H	∞

H1.3 ハイブリダイゼーションミックスの調製

1. Hyb試薬を融解し、ボルテックスで混合し、スピンドウンします。



Hyb NとHyb Sに融解後沈殿物がある場合、60°Cで加熱し、沈殿物が容解するまでボルテックスで混合してください。

2. マイクロ遠心(MC)チューブでハイブリダイゼーションミックスを調製し、短時間ボルテックスで混合し、スピンドウンします。下記はピペティングエラーを考慮した容量です。

Component	μL / Reaction	
Hyb N	9.25	
Hyb D	3.5	
Hyb S*	0.5	* Hyb Sを加えると濁りますが、ステップ3でクリアになります。
Hyb R	1.25	
H2O (round 1 / round 2)	1.1 / 4.4	濃縮1回目: 1.1 μL 2回目: 4.4 μL
Baits (round 1 / round 2)	4.4 / 1.1	濃縮1回目: 4.4 μL 2回目: 1.1 μL
TOTAL	20	

3. ハイブリダイゼーションミックスを60℃のヒートブロックで10分インキュベートします。チューブ内に付着する凝縮物を回収するために時々ボルテックスで混合します。ヒートブロックから取り出し、5分間室温で静置します。
4. キャプチャー反応ごとに、18.5 μLのハイブリダイゼーションミックスを0.2 mLチューブに分注します。

この分注したハイブリダイゼーションミックスを“HYBs”とします

H1.4 ブロッカーミックスの調製

1. 下記の表に基づき、ターゲット種に応じたブロッカーミックスを適切なチューブに加え、ピペティングで混合します。下記はピペティングエラーを考慮した容量です。

MOST TAXA		PLANTS		SALMONIDS	
Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction
Block O	2.5	Block O	5.0	Block O	-
Block C	2.5	Block C	-	Block C	2.5
Block X	0.5	Block X	0.5	Block X	0.5
NF Water	-	NF Water	-	NF Water	2.5
TOTAL	5.5	TOTAL	5.5	TOTAL	5.5

2. キャプチャー反応ごとに、5 μLのブロッカーミックスを0.2 mLチューブに分注します。
3. 7 μL の一つのあるいはプールしたライブラリーをそれぞれブロッカーミックスに加え、ピペティングで混合します。

このライブラリーとアダプターブロッカーミックスの混合物を“LIBs”とします

H1.5 反応

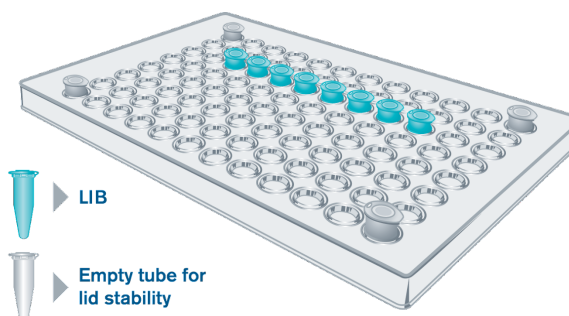
ダブルチェックをしてください：



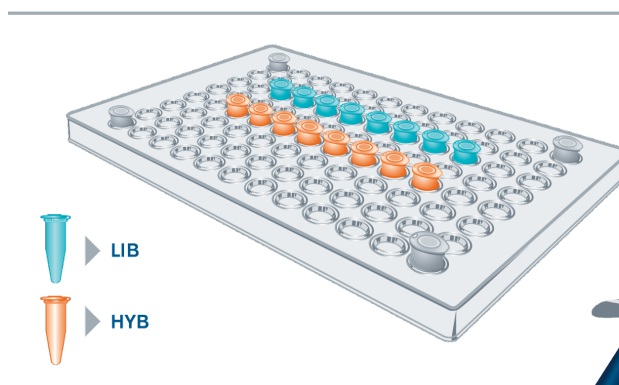
蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10℃高く設定してください

Step	Temperature	Time
1	95°C	5m
2	T _H	5m
3	T _H	∞

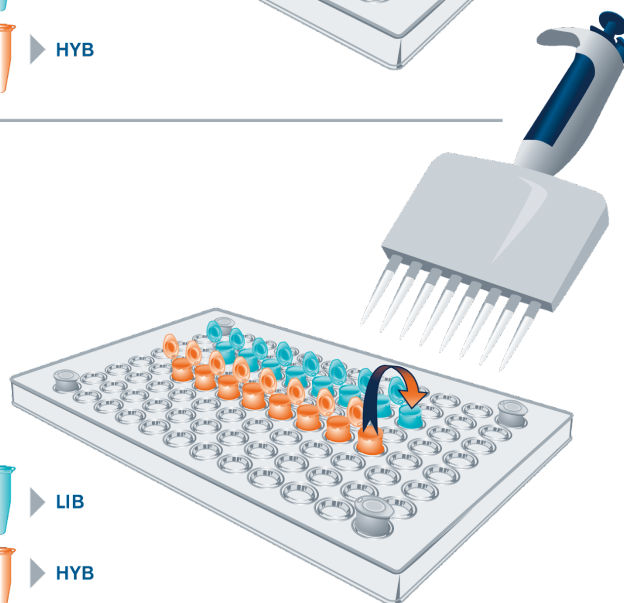
1. サーマルサイクラーに **LIB** チューブをセットし、蓋を閉じて、温度プログラムを開始します。



2. サーマルサイクラーがステップ 2 のハイブリダイズ温度に達したら、プログラムを一時停止します。サーマルサイクラーに **HYB** チューブをセットし、蓋を閉じて、プログラムを再開します。



3. プログラムのステップ 2 が完了したら、すべてのチューブをサーマルサイクラーに残したまま、各 **LIB** に 18 μL の各 **HYB** を加えます。マルチチャンネルピペッターを使用すると、簡単に作業できます。5 回ピペティングして穏やかに混合します。



4. **HYB** チューブを廃棄します。**LIB** チューブを短時間スピンドウンした後、サーマルサイクラーに戻し、蓋を閉めてオーバーナイト（16-24 時間）でインキュベートしハイブリダイズさせます。

パート2： 結合と洗浄（クリーンナップ）

ベイトとターゲットのハイブリッドをストレプトアビジンでコートされた磁気ビーズと結合させます。続いて、温めたバッファーで数回洗浄し、ほとんどの非ターゲットDNAを除去します。この操作は通常、パート1完了の翌日に行います。

H2.1 洗浄温度(T_w)の選択(通常 T_H と同じ)

63°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15%以下と予測される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-20%と予想される場合

55°C

ベイトとターゲットで配列の違いが25%以上と予想される場合

H2.2 必要な試薬と機器・消耗品



ハイブリダイゼーションを止める少なくとも90分前に開始してください。

Reagents

Hyb S (Box 1) *

Binding Buffer (Box 1) *

Wash Buffer (Box 1) *

Beads (Box 1)

Nuclease-free (NF) Water (up to 900 μ L per reaction)

すべての試薬を室温にしておいてください。沈殿物がある場合、60°Cで加熱し、沈殿物が溶解するまでボルトックスで混合してください。

Equipment

Water bath or incubation oven set to the T_w (e.g., 65°C)

Receptacles for 50 mL tubes, 0.2 mL strips and microcentrifuge tubes compatible with above incubation device

Vortex mixer and mini-centrifuge for 0.2 mL strips and MC tubes

Magnetic particle collector(s) (MPC) for above strips and/or tubes

When using only a microcentrifuge (MC) tube-compatible MPC	When using a 0.2 mL tube-compatible MPC
Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 44 cleanups	Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 68 cleanups
Nuclease-free MC tubes, 1 per reaction	Nuclease-free 0.2 mL PCR strips with individually-attached lids, 1 vessel per reaction
Heat block set to the T_w	Thermal cycler set to T_w
Pipettors and tips for 20 – 500 μ L	Pipettors and tips for 20 – 200 μ L; multichannel pipettor strongly recommended

H2.3 Wash Buffer Xの調製

このステップは、マイクロ遠心（MC）チューブでの44反応の洗浄フォーマットに、0.2 mLチューブでの68反応の洗浄フォーマットに十分なWash Buffer Xを作成します。必要に応じて作成量を調整してください。

H2.3 Wash Buffer Xの調製 (続き)

1. Wash BufferとHyb Sを、それぞれ沈殿物を溶解させ完全に混合します。必要に応じて短時間温めます。
2. 400 μ LのHyb Sと39.6 mLのNF水、および10 mLのWash Bufferを50 mLチューブに入れます。ボルテックスで完全に混合し、“Wash Buffer X”とラベルをつけておきます。

Wash Buffer Xは4°Cで1か月間保存できます。

3. 少なくとも使用前の30分間、ウォーターバスかインキュベーションオープンでWash Buffer Xを洗浄温度 (T_w) で加熱します。

H2.4 ビーズの準備 ビーズは使用直前に十分懸濁してください

1. MCチューブにキャプチャー反応ごとに30 μ Lのビーズ溶液を入れます。
2. MPCにチューブをセットし、ビーズがペレットとなり、溶液が透明になるまで静置します (1-2分)。
チューブをMPCに置いたまま上清を除去し廃棄します。
3. 200 μ LのBinding Bufferをビーズペレットに加ええます。ボルテックスでビーズを再懸濁し、スピンドウンします。
MPCにチューブをセットし、ビーズをペレット化させます。上清を除去し廃棄します。
4. 3.の工程を2回繰り返し、合計3回洗浄します。
5. 洗浄したビーズを70 μ LのBinding Bufferで再懸濁します。0.2 mLフォーマットで洗浄する場合は、PCRストリップチューブに再懸濁液を移します。

ヒント: ビーズはMCチューブを利用して、8 (以下) の反応数 (最大240 μ L) で調製できます。MCチューブ1本ですべての反応数分の試薬を調製します。すなわち8反応分の場合、1.6 mLのBinding bufferで洗浄し、560 μ LのBinding Bufferで再懸濁し、70 μ Lの懸濁液を個々のチューブに分注します。

H2.5 ビーズとハイブリッドの結合

1. ビーズ溶液を T_w で少なくとも2分間加熱します。
2. 各キャプチャー反応物 (H1.5-4) を加熱したビーズ溶液に加え、ピペティングで混合します。
3. ライブラリーとビーズの混合物 (H2.5-2) をヒートブロックかサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。ビーズを攪拌された状態に保つために、2.5分経過したらチューブをフリックあるいは反転させ、その後短時間ピンダウンします。

H2.6 ビーズの洗浄

1. 溶液が透明になるまで、MPCでビーズをペレット化します。上清を除去し廃棄します。
TIP: この上清は、同じあるいは異なるバイトで再キャプチャーするためのバックアップとして保存することができます。
2. 加熱した375 μ L (MCチューブフォーマット) あるいは180 μ L (0.2 mLチューブフォーマット) のWashing Buffer Xをビーズに加え、MPCから取り出し、ヒートブロックに15秒置いたのち、短時間のボルテックスあるいはピペティングにより混合します。チューブを短時間スピンドウンします。
3. T_w のヒートブロックあるいはサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。2.5分経過したら軽くボルテックスすることによって攪拌し、短時間スピンドウンします。
4. 1.から3.の工程をMCチューブフォーマットでは2回 (合計3回)、0.2 mLチューブフォーマットでは3回 (合計4回) 繰り返します。最後の洗浄が終了したら、ビーズペレットには触れずに可能な限り溶液を取り除きます。

パート3: ライブラリーの再懸濁と増幅

ビーズに結合した濃縮ライブラリーをBuffer Eに懸濁し、増幅します。

H3.1 必要な試薬と機器・消耗品

Reagents	Equipment
Buffer E (Box 2)	Tubes appropriate for PCR master mix assembly
PCR primers for amplifying libraries (e.g., P5 and P7)	Tubes or strips for 50 µL PCR amplification
PCR reagents for post-capture amplification	Pipettors and tips capable of 5 – 100 µL volumes
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
Nuclease-free (NF) Water	Thermal cycler


H3.2 濃縮したライブラリーの回収

1. 洗浄したビーズ (H2.6-4) に30 µLのBuffer Eを加え、ピペティングにより完全に再懸濁します。次のステップは、お客様の用いるライブラリー増幅試薬により、下記のワークフローAあるいはBを選択してください。

ワークフローA : KAPA HiFi HotStart あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase を使用する場合	ワークフローB : ワークフローA 以外のポリメラーゼシステムを使用する場合
2A. このビーズ懸濁液を増幅のテンプレートとして、直接H3.3 に進んでください。	2B. ビーズ懸濁液を 95°Cで 5 分間インキュベートします。
	3B. すぐに MPC でビーズをペレット化し、エンリッチされたライブラリーを含む上清を回収します。

H3.3 ライブラリーの増幅

下記はKAPA HiFi HotStart Ready MixおよびIlluminaのライブラリーで、キャプチャー後の増幅を行った例です。

 一回目のH3.3ステップでは、1濃縮反応につき2つの反応を行ってください（それぞれ15 µLの濃縮ライブラリーをテンプレートにします）。二回目のステップでは、1反応を行います。

1. 下記のPCR反応液を準備します

Component	Final Concentration	µL / Reaction	Sequence
NF Water	-	5	-
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	1 X	25	-
P5 library primer (at 10 µM)	500 nM	2.5	AATGATACGGCGACCACCGA
P7 library primer (at 10 µM)	500 nM	2.5	CAAGCAGAAGACGGCATACGA
Enriched Library (on- or off-bead)	-	15 *	-
TOTAL		50	-

* 残りのビーズに結合したライブラリーは-20°Cで数か月保存できます。

H3.3 ライブラリーの増幅（続き）

2. 以下のプログラムで反応を行います。

Step	Temperature	Time	
1	98°C	2 minutes	
2	98°C	20 seconds	×14 or 8 cycles*
3	60°C	30 seconds	
4	72°C	45 seconds	
5	72°C	5 minutes	
6	8°C	∞	

*濃縮1回目: 14
濃縮2回目: 8

3. 増幅後、精製を行ってください。

- 反応溶液にビーズが含まれており、シリカカラムを用いて精製する場合、ビーズをペレット化したのちに上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。
- 上記以外の場合、いずれかのPCR精製システム（シリカカラムやSPRIビーズなど）を使用して反応溶液を精製します。

H3.4 2回目の濃縮反応

H3.3までを1回終了した場合(1/2回目) :

1. 精製した増幅産物を混合し、7 μL に濃縮します。
2. 濃縮したテンプレートをサンプルとして、H1.1 から H3.3 までのステップを繰り返します。

H3.3までを2回終了した場合 :

これで、ライブラリーの濃縮は完了です。定量、品質チェックを行い、シーケンシングを行えます。

付録

HA1: トラブルシューティング

ハイブリダイゼーション中にサーマルサイクラーの温度がハイブリダイズ温度より下がってしまいました。

完全に濃縮が失敗するわけではありませんが、温度が維持された場合に比べてオンターゲットのリード率とターゲットのリードの複雑さが下がることが予測されます。予備試験として浅くシーケンシングすることで、ターゲットが十分なカバレッジを得られるかどうか判断できます。

濃縮し、増幅したライブラリーが電気泳動（あるいは同様の装置）で観察できません

キャプチャーに成功したライブラリーは再増幅した後も全量が数ngであることが多く、この量は電気泳動では観察することができません。これは特にターゲットが小さいか（100 bp以下）、出発材料中でのターゲットDNAの割合が低い（例、分解・古代・環境DNA）、キャプチャー後のライブラリーの再増幅が少なかった場合に一般的にみられます。多くの場合、ライブラリー増幅をさらに数サイクル行くと、電気泳動で十分観察される濃度になります。あるいは、ライブラリーがシーケンスに十分な量かどうかをqPCRで定量することができます。PCRのプラトーに達する前にサイクルを止めた場合、電気泳動でqPCR産物の長さの分布を観察することができます。ライブラリーの濃度と量については、シーケンスプロバイダーにご相談ください。

濃縮し、増幅したライブラリーが元のライブラリーよりかなり長い、ピークが二つあります。

これは、ライブラリーが増幅されすぎたことで、テンプレートの伸長なしに変性-再生が起こり'daisy-chains'あるいは'bubbles'と呼ばれる構造を形成した場合に起こります。これは通常のライブラリー増幅法でPCRを3サイクル行うことで元のライブラリーの状態に戻すことができます。

濃縮したライブラリーのシーケンスデータで、PCR重複が高い確率で見られました

シーケンスデータ中の重複率（つまり"clonalityあるいは"duplication rate"）は深く読むほど増加し、実験前にシーケンス深度が適正化されている場合のみ実験間で正しく比較できます。得られた生シーケンスリードをX軸に、ユニークリードをY軸にしてプロットすることで、ライブラリーがオーバーシーケンスされたかどうかを評価することができます。この'**complexity curve**'がプラトーに達しているが、十分なユニークリードを得られている場合、必要以上に深くシーケンスされたと考えられます。プロットが平らにならなかった場合、あるいはライブラリーの潜在的なユニークリードの収量を増やしたい場合、**ライブラリー調製に用いるDNAの量を増やす、あるいはキャプチャー反応あたりのライブラリー量を増やしてください。キャプチャー前にベイトを希釈しないでください。**重度に汚染または損傷したDNAをターゲットとして用いる場合、キャプチャーの感度を改善するためにすべてのステップで温度を下げることを検討してください。可能な場合、PCRサイクルを減らすことで、得られたシーケンス深度でのターゲットのカバレッジの均一性と複雑さを改善できる可能性があり、いくつかのケースでは重複率に非直接的な効果がある場合があります。NGSアプリケーションにおけるライブラリーの複雑さについてはDaley & Smith 2013 (doi: 10.1038/nmeth.2375)に情報が 있습니다。

HA2: myBaits高感度プロトコルクイックガイド

1. 反応ごとに、下記の試薬を調製します（ピペットエラーは調整済みです）

Hybridization Mix	
Component	μL / Reaction
Hyb N	9.25
Hyb D	3.5
Hyb S	0.5
Hyb R	1.25
Baits (round 1 / 2)	4.4 / 1.1
H2O (round 1 / 2)	1.1 / 4.4
TOTAL	20

Blockers Mix	
Component	μL / Reaction
Block X	0.5
Block C	2.5 [†]
Block O	2.5*
NF Water	0 [†]
TOTAL	5.5

[†] Plants: 0; Salmonids: 2.5

*Plants: 5.0; Salmonids: 0

2. ハイブリダイゼーションミックスを 60°C で 10 分間加熱したのち、1 反応あたり **18.5 μL** のハイブリダイゼーションミックスをそれぞれのチューブに分注します（“HYBs”）。
3. 反応ごとに、**5 μL** のブロッカーミックスを分注し、**7 μL** のライブラリーを混合します（“LIBs”）。
4. 95°C のサーマルサイクラーで LIBs を 5 分間インキュベートし、ハイブリダイズ温度に下げます。ヒートリッドにしてください。
5. HYBs をサーマルサイクラーにセットし、ハイブリダイズ温度で 5 分間加熱します。
6. **18 μL** の HYB をそれぞれの LIB に加えてピペティングで混合し、16-24 時間インキュベートします。
7. **9. を行う 1.5 時間前に** 400 μL の HybS と 39.6 mL の ヌクレアーゼフリー水と 10 mL の Wash Buffer を 50 mL チューブで混合し、Wash Buffer X を作成します。ボルテックスで完全に混合し、ハイブリダイズ温度で少なくとも 45 分間加熱します。
8. 1 反応あたり 30 μL のビーズを 200 μL の Binding Buffer で 3 回洗浄し準備しておきます。70 μL の Binding Buffer でビーズを再懸濁し、少なくとも 2 分間ハイブリダイズ温度で加熱します。
9. 加熱したビーズとハイブリダイズ反応物を混合し、ハイブリダイズ温度で 5 分間インキュベートします。2.5 分経過したら懸濁します。
10. ビーズをペレット化し、上清を除去します。洗浄にマイクロ遠心チューブを使用する場合、375 μL の加熱した Wash Buffer X で 3 回洗浄し、ハイブリダイズ温度で 5 分インキュベートします。0.2 mL チューブを使用する場合 180 μL で 4 回洗浄します。
11. 30 μL の Buffer E でビーズを再懸濁し、このうち 15 μL を KAPA® HiFi あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase システムでの 50 μL の系で増幅反応に使用します。その他のポリメラーゼシステムを使用する場合、ビーズ懸濁液を 95°C で 5 分間インキュベートし、すぐにビーズをペレット化し、15 μL の上清を 50 μL の系で増幅反応に使用します。1 回目の濃縮では 2 つの反応を行います。2 回目の濃縮では 1 つの反応を行います。
12. 増幅反応物をシリカカラムか SPRI ビーズで精製します。**ビーズが増幅反応物に含まれていた場合、ビーズをペレット化し、上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。**
13. ここまで 1 回目の濃縮が終了したら、キャプチャー後増幅物を混合し、7 μL に濃縮し、1-12 のステップを繰り返します。2 回目の濃縮が終了したら、ライブラリーの濃縮は終了し、品質チェックを行い、シーケンシングします。



ロングインサートプロトコル

インサートの長さが1-10 kbのNGSライブラリー

目次

必要条件と推奨事項	
ライブラリーのインプット	30
ブロッキングオリゴ	30
ロングインサートライブラリーの扱いに関する特記事項	30
キット以外に必要な機器・消耗品・試薬	31
手順 パート1：ハイブリダイゼーション	
L1.1 ハイブリダイズ温度の選択	32
L1.2 必要な試薬と機器・消耗品	32
L1.3 ハイブリダイゼーションミックスの調製	33
手順 パート2：結合と洗浄	
L2.1 洗浄温度の選択	34
L2.2 必要な試薬と機器・消耗品	34
L2.3 Wash Buffer Xの調製	35
L2.4 ビーズの準備	35
L2.5 ビーズとハイブリッドの結合	35
L2.6 ビーズの洗浄	35
手順 パート3：ライブラリーの再懸濁と増幅	
L3.1 必要な試薬と機器・消耗品	36
L3.2 濃縮したライブラリーの回収	36
L3.3 ライブラリーの増幅	36
付録	
LA1 トラブルシューティング	38
LA2 myBaitsロングインサートプロトコルクイックガイド	39

必要条件と推奨事項

ライブラリーのインプット

ライブラリー形式 myBaitsはユニバーサルアダプタープライミングサイトを有し、PCRで増幅した、あるいは増幅可能なNGSライブラリーに用いることができます。ロングインサートライブラリーはWitek et al. 2016 (doi: 10.1038/protex.2016.027)の方法に従って調製することを推奨します。myBaitsをPCRフリーのライブラリーに用いることは推奨しません。さらに、myBaitsはオリジナルのNexteraあるいはNextera XTライブラリー調製キットで調製したライブラリーや、ビオチンを含むライブラリーには互換性がありません。PCRがジャンプしてしまうことによるミスインデックスの危険性を減少させるため、ライブラリーのデュアルインデックス化を強く推奨します。

容量 myBaitsのターゲット濃縮反応には、トータルで7 μ lのNGSライブラリーを加えられます。多くの場合、ライブラリーをプールするには真空遠心分離や他の手段でライブラリーを濃縮する必要があります。このステップはmyBaitsの実験を始める前に行ってください。ライブラリーはヌクレアーゼフリーのバッファーク水に懸濁してください。

質量 ロングインサートライブラリーのキャプチャーには、濃縮反応あたりトータルで250 ngのライブラリーを用いることを推奨します。インターカレート法によるダイアッセイ（例、Qubit）で定量してください。

プール 最適なプールパラメーター（ライブラリーの数とライブラリー総質量の両方の観点から）はライブラリーのタイプとベイトセットにより変わり、決定するには試行が必要ですが、多くの構成ではうまく機能するはずですが。プールされたサンプル間のキャプチャパフォーマンスのばらつきを最小限に抑えるために、予想されるベイトとゲノム配列の同一性（分類群）、DNA品質、開始DNA量、ライブラリーインサートの長さ、および相対的なターゲットゲノム量とバックグラウンドに基づいて、同等なライブラリーのみをプールします。それぞれのライブラリーは同量ずつプールしてください。ロングインサートライブラリーのキャプチャーには、1反応あたり3ライブラリーを、1ライブラリーを83 ngずつ、計250 ngまでをプールすることを推奨します。

ブロッキングオリゴ

myBaitsキットをご注文の際は、濃縮するライブラリーの構成をお知らせください。キットに標準で添付するアダプターブロッキング試薬（**Block X**）はIllumina TruSeqシリーズかNexteraシリーズを用いて、シングルで6-12 bp、あるいはデュアルで6-12 bpのインデックス化を行ったライブラリーに対応しています。Ion TorrentフォーマットではBlock Aが添付します。その他のアダプター構成では、お客様のNGSライブラリーのアダプター配列用にCustom IDT® xGen® Blocking Oligoを注文することを推奨します。myBaitsキットのBlock Xの代わりに、1 μ g/ mLの濃度でどのカスタムアダプターブロッキングオリゴでも使用することができます。

ロングインサートライブラリーの扱いに関する特記事項

ビーズ（MyOne C1あるいはSPRI）とロングインサートライブラリーの混合には、ボルテックスではなくピペティングでおだやかに混合することで、機械的せん断を防ぎます。

キット以外に必要な機器・消耗品

Item	Notes
50 mL tubes	1 per 44 reactions
Microcentrifuge tubes (1.5, 1.7, or 1.8 mL)	2 per 8 reactions
0.2 mL PCR strips with attached lids	2 per 8 reactions (e.g., VWR Cat# 93001-118)
Pipettors and tips for 0.5 - 500 μ L	Multichannel for 20 and 500 μL recommended
[†] Thermal cycler with heated lid compatible with 0.2 mL strips	1 or 2
Magnetic particle collector for microcentrifuge tubes	1 (e.g., ThermoFisher Cat# 12321D)
Magnetic particle collector for 0.2 mL strips	1 (e.g., Permagen Cat# S500)
Vortex mixer and mini-centrifuge for tubes and strips	
Water bath or incubation oven at 65°C	
Heat block for microcentrifuge tubes at 60°C	

[†] 使用するサーマルサイクラーとPCRストリップチューブで、65°Cオーバーナイトの反応で、30 μ Lの反応液の蒸発量が4 μ L以下であることを確認してください。

キット以外に必要な試薬

Reagent	Notes
Nuclease-free ("NF") water	900 μ L per reaction
PCR primers to amplify sequencing libraries after capture, e.g.:	
Illumina P5: AATGATACGGCGACCACCGA	2.5 μ L @ 10 μ M per reaction
Illumina P7: CAAGCAGAAGACGGCATACGA	2.5 μ L @ 10 μ M per reaction
PCR reagents for post-capture amplification	1 per reaction (e.g. Roche Cat# 07958927001)
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	1 cleanup per reaction

手順

パート1： ハイブリダイゼーションのセットアップ

シーケンスライブラリーをさまざまなブロッキングオリゴと混合し、変性し、その後ベイトを含むその他のハイブリダイゼーション試薬と混合します。これらのハイブリダイゼーション反応液を数時間インキュベートし、ベイトが標的ライブラリー分子とハイブリダイズできるようにします。

L1.1 ハイブリダイズ温度(T_H)の選択

65°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10%以下と予想される場合

62°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10-15%と予想される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-25%と予想される場合

L1.2 必要な試薬と機器・消耗品

Reagents
Hyb N and Hyb S from Box 1
Hyb D and Hyb R from Box 2
Block C, Block O, and Block X from Box 2
Baits from Box 3 KEEP ON ICE
Libraries or library pools in 7 μ L per reaction

Equipment
Nuclease-free microcentrifuge tubes ($\times 2$)
0.2 mL strips with attached lids ($\times 1$ per 8 reactions)
Pipettors and tips; multichannel for 20 μ L recommended
Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
Heat block set to 60°C
Thermal cycler(s); 2 blocks recommended for 24 or more reactions

サーマルサイクラーのプログラム:



蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10°C高く設定してください。

Step	Parameters
1	60°C, 10 minutes
2	95°C, 10 minutes
3	Reduce 0.1°C per second to T_H
4	Hold at T_H

L1.3 ハイブリダイゼーションミックスの調製

- Hyb試薬を融解し、ボルテックスで混合し、スピンドウンします。

 Hyb NとHyb Sに融解後沈殿物がある場合、60℃で加熱し、沈殿物が溶解するまでボルテックスで混合してください。


- 下記の表に基づき、ターゲット種に応じたキャプチャーミックスをマイクロ遠心(MC)チューブで調製します。下記はピペティングエラーを考慮した容量です。

MOST TAXA		PLANTS		SALMONIDS	
Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction
Hyb N	9.25	Hyb N	9.25	Hyb N	9.25
Hyb D	3.5	Hyb D	3.5	Hyb D	3.5
Hyb S*	0.5	Hyb S*	0.5	Hyb S*	0.5
Hyb R	1.25	Hyb R	1.25	Hyb R	1.25
Block O	2.5	Block O	5.0	Block O	-
Block C	2.5	Block C	-	Block C	2.5
Block X	0.5	Block X	0.5	Block X	0.5
NF Water	-	NF Water	-	NF Water	2.5
Baits	5.5	Baits	5.5	Baits	5.5
TOTAL	25.5	TOTAL	25.5	TOTAL	25.5

*Hyb Sを加えると濁りますが、ステップ3でクリアになります。

短時間ボルテックスし、スピンドウンして溶液を回収します。

- キャプチャー反応ごとに、**23 μL**のハイブリダイゼーションミックスを0.2 mLチューブに分注します。
- 7 μLの一つのあるいはプールしたライブラリーをそれぞれキャプチャーミックスに加え、ピペティングでおだやかに混合します。
- サーマルサイクラーにチューブをセットし、下記プログラムでオーバーナイトで反応させます。

 蒸発を最小限にするため、蓋の温度を各ステップの温度より5-10℃高く設定してください

Step	Parameters
1	60°C, 10 minutes
2	95°C, 10 minutes
3	Reduce 0.1°C per second to T _H
4	Hold at T _H

パート2： 結合と洗浄（クリーンナップ）

ベイトとターゲットのハイブリッドをストレプトアビジンでコートされた磁気ビーズと結合させます。続いて、温めたバッファーで数回洗浄し、ほとんどの非ターゲットDNAを除去します。この操作は通常、パート1完了の翌日に行います。

 **ロングインサートライブラリーでは、ボルテックスではなくピペティングでおだやかに混合することで、機械的せん断を防ぎます。**

L2.1 洗浄温度(T_w)の選択（通常 T_H と同じ）

65°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10%以下と予想される場合

62°C

ベイトとターゲットで配列の違いが10-15%と予想される場合

60°C

ベイトとターゲットで配列の違いが15-25%と予想される場合

L2.2 必要な試薬と機器・消耗品

 **ハイブリダイゼーションを止める少なくとも90分前に開始してください。**

Reagents

Hyb S (Box 1) *

Binding Buffer (Box 1) *

Wash Buffer (Box 1) *

Beads (Box 1)

Nuclease-free (NF) Water (up to 900 μ L per reaction)

* すべての試薬を室温にしておいてください。沈殿物がある場合、60°Cで加熱し、沈殿物が溶解するまでボルテックスで混合してください。

Equipment

Water bath or incubation oven set to the T_w (e.g., 65°C)

Receptacles for 50 mL tubes, 0.2 mL strips and microcentrifuge tubes compatible with above incubation device

Vortex mixer and mini-centrifuge for 0.2 mL strips and MC tubes

Magnetic particle collector(s) (MPC) for above strips and/or tubes

When using only a microcentrifuge (MC) tube-compatible MPC	When using a 0.2 mL tube-compatible MPC
Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 44 cleanups	Nuclease-free 50 mL tube, 1 per 68 cleanups
Nuclease-free MC tubes, 1 per reaction	Nuclease-free 0.2 mL PCR strips with individually-attached lids, 1 vessel per reaction
Heat block set to the T_w	Thermal cycler set to T_w
Pipettors and tips for 20 – 500 μ L	Pipettors and tips for 20 – 200 μ L; multichannel pipettor strongly recommended

L2.3 Wash Buffer Xの調製

このステップは、マイクロ遠心（MC）チューブでの44反応の洗浄フォーマットに、0.2 mLチューブでの68反応の洗浄フォーマットに十分なWash Buffer Xを作成します。必要に応じて作成量を調整してください。

1. Wash BufferとHyb Sを、それぞれ沈殿物を溶解させ完全に混合します。必要に応じて短時間温めます。
2. 400 μ LのHyb Sと39.6 mLのNF水、および10 mLのWash Bufferを50 mLチューブに入れます。ボルテックスで完全に混合し、“Wash Buffer X”とラベルをつけておきます。

Wash Buffer Xは4°Cで1か月間保存できます。

3. 少なくとも使用前の30分間、ウォーターバスかインキュベーションオープンでWash Buffer Xを洗浄温度（ T_w ）で加熱します。

L2.4 ビーズの準備 ビーズは使用直前に十分懸濁してください

1. MCチューブにキャプチャー反応ごとに30 μ Lのビーズ溶液を入れます。
2. MPCにチューブをセットし、ビーズがペレットとなり、溶液が透明になるまで静置します（1-2分）。チューブをMPCに置いたまま上清を除去し廃棄します。
3. 200 μ LのBinding Bufferをビーズペレットに加えます。ボルテックスでビーズを再懸濁し、スピンドウンします。MPCにチューブをセットし、ビーズをペレット化させます。上清を除去し廃棄します。
4. 3.の工程を2回繰り返し、合計3回洗浄します。
5. 洗浄したビーズを70 μ LのBinding Bufferで再懸濁します。0.2 mLフォーマットで洗浄する場合は、PCRストリップチューブに再懸濁液を移します。

ヒント：ビーズはMCチューブを利用して、8（以下）の反応数（最大240 μ L）で調製できます。MCチューブ1本ですべての反応数分の試薬を調製します。すなわち8反応分の場合、1.6 mLのBinding bufferで洗浄し、560 μ LのBinding Bufferで再懸濁し、70 μ Lの懸濁液を個々のチューブに分注します。

L2.5 ビーズとハイブリッドの結合

1. ビーズ溶液を T_w で少なくとも2分間加熱します。
2. 各キャプチャー反応物（L1.3-5）を加熱したビーズ溶液に加え、ピペティングで混合します。
3. ライブラリーとビーズの混合物（L2.5-2）をヒートブロックかサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。ビーズを攪拌された状態に保つために、2.5分経過したらチューブをフリックあるいは反転させ、その後短時間スピンドウンします。

L2.6 ビーズの洗浄

1. 溶液が透明になるまで、MPCでビーズをペレット化します。上清を除去し廃棄します。
2. 加熱した375 μ L（MCチューブフォーマット）あるいは180 μ L（0.2 mLチューブフォーマット）のWashing Buffer Xをビーズに加え、MPCから取り出し、ヒートブロックに15秒置いたのち、短時間のボルテックスあるいはピペティングにより混合します。チューブを短時間スピンドウンします。
3. T_w のヒートブロックあるいはサーマルサイクラーで5分間インキュベートします。2.5分経過したら軽くボルテックスすることによって攪拌し、短時間スピンドウンします。
4. 1.から3.の工程をMCチューブフォーマットでは2回（合計3回）、0.2 mLチューブフォーマットでは3回（合計4回）繰り返します。**最後の洗浄が終了したら、ビーズペレットには触れずに可能な限り溶液を取り除きます。**

パート3: ライブラリーの再懸濁と増幅

ビーズに結合した濃縮ライブラリーをBuffer Eに懸濁し、増幅します。

L3.1 必要な試薬と機器・消耗品

Reagents	Equipment
Buffer E (Box 2)	Tubes appropriate for PCR master mix assembly
PCR primers for amplifying libraries (e.g., P5 and P7)	Tubes or strips for 50 μ L PCR amplification
PCR reagents for post-capture amplification	Pipettors and tips capable of 5 – 100 μ L volumes
PCR purification system, e.g., silica columns or SPRI beads	Vortex mixer and mini-centrifuge for above tube types
	Thermal cycler

L3.2 濃縮したライブラリーの回収

1. 洗浄したビーズ (L2.6-4) に30 μ LのBuffer Eを加え、ピペッティングにより完全に再懸濁します。次のステップは、お客様の用いるライブラリー増幅試薬により、下記のワークフローAあるいはBを選択してください。

ワークフローA : KAPA HiFi HotStart あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase を使用する場合

- 2A. このビーズ懸濁液を増幅のテンプレートとして、直接L3.3 に進んでください。

ワークフローB : ワークフローA 以外のポリメラーゼシステムを使用する場合

- 2B. ビーズ懸濁液を 95°Cで 5 分間インキュベートします。
- 3B. すぐに MPC でビーズをペレット化し、エンリッチされたライブラリーを含む上清を回収します。

L3.3 ライブラリーの増幅

下記はKAPA HiFi HotStart Ready MixおよびIlluminaのライブラリーで、キャプチャー後の増幅を行った例です。

1. 下記の PCR 反応液を準備します

Component	Final Concentration	μ L / Reaction	Sequence
NF Water	-	5	-
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	1 X	25	-
P5 library primer (at 10 μ M)	500 nM	2.5	AATGATACGGCGACCACCGA
P7 library primer (at 10 μ M)	500 nM	2.5	CAAGCAGAAGACGGGCATACGA
Enriched Library (on- or off-bead)	-	10 *	-
TOTAL		50	-

* 残りのビーズに結合したライブラリーは-20°Cで数か月保存できます。

L3.3 ライブラリーの増幅（続き）

2. 以下のプログラムで反応を行います。

Step	Temperature	Time
1	98°C	3 minutes
2	95°C	30 seconds
3	62°C	20 seconds
4	68°C	10 minutes
6	8°C	∞

x25
cycles*

*最低限のサイクルで行ってください。シーケンスプラットフォームによっては、必要なモル濃度を満たすに25サイクル以上になる可能性があります。

3. 増幅後、精製を行ってください。

- **反応溶液にビーズが含まれており、シリカカラムを用いて精製する場合**、ビーズをペレット化したのちに上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。
- 上記以外の場合、いずれかのPCR精製システム（シリカカラムやSPRIビーズなど）を使用して反応溶液を精製します。

濃縮したライブラリーを定量し、品質チェックを行い、必要があれば追加のサイズセレクションを行い、プラットフォーム用にライブラリー調製を行い、シーケンシングを行います。

このライブラリー増幅でプラットフォーム（例、PacBio、Oxford Nanopore）用のライブラリーに量が満たない場合、残りの増幅されていないライブラリーを用いて追加の増幅を行ってください。

付録

LA1: トラブルシューティング

ハイブリダイゼーション中にサーマルサイクラーの温度がハイブリダイズ温度より下がってしまいました。

完全に濃縮が失敗するわけではありませんが、温度が維持された場合に比べてオンターゲットのリード率とターゲットのリードの複雑さが下がることが予測されます。予備試験として浅くシーケンシングすることで、ターゲットが十分なカバレッジを得られるかどうか判断できます。

濃縮し、増幅したライブラリーが電気泳動（あるいは同様の装置）で観察できません

キャプチャーに成功したライブラリーは再増幅した後も全量が数ngであることが多く、この量は電気泳動では観察することができません。これは特にターゲットが小さいか（100 bp以下）、出発材料中でのターゲットDNAの割合が低い（例、分解・古代・環境DNA）、キャプチャー後のライブラリーの再増幅が少なかった場合に一般的にみられます。多くの場合、ライブラリー増幅をさらに数サイクル行くと、電気泳動で十分観察される濃度になります。あるいは、ライブラリーがシーケンスに十分な量かどうかをqPCRで定量することができます。PCRのプラトーに達する前にサイクルを止めた場合、電気泳動でqPCR産物の長さの分布を観察することができます。ライブラリーの濃度と量については、シーケンスプロバイダーにご相談ください。

濃縮し、増幅したライブラリーが元のライブラリーよりかなり長い、ピークが二つあります。

これは、ライブラリーが増幅されすぎたことで、テンプレートの伸長なしに変性-再生が起こり'daisy-chains'あるいは'bubbles'と呼ばれる構造を形成した場合に起こります。これは通常のライブラリー増幅法でPCRを3サイクル行うことで元のライブラリーの状態に戻すことができます。

濃縮したライブラリーのシーケンスデータで、PCR重複が高い確率で見られました

シーケンスデータ中の重複率（つまり"clonalityあるいは"duplication rate"）は深く読むほど増加し、実験前にシーケンス深度が適正化されている場合のみ実験間で正しく比較できます。得られた生シーケンスリードをX軸に、ユニークリードをY軸にしてプロットすることで、ライブラリーがオーバーシーケンスされたかどうかを評価することができます。この'**complexity curve**'がプラトーに達しているが、十分なユニークリードを得られている場合、必要以上に深くシーケンスされたと考えられます。プロットが平らにならなかった場合、あるいはライブラリーの潜在的なユニークリードの収量を増やしたい場合、**ライブラリー調製に用いるDNAの量を増やす、あるいはキャプチャー反応あたりのライブラリー量を増やしてください。キャプチャー前にベイトを希釈しないでください。**重度に汚染または損傷したDNAをターゲットとして用いる場合、キャプチャーの感度を改善するためにすべてのステップで温度を下げることを検討してください。可能な場合、PCRサイクルを減らすことで、得られたシーケンス深度でのターゲットのカバレッジの均一性と複雑さを改善できる可能性があり、いくつかのケースでは重複率に非直接的な効果がある場合があります。NGSアプリケーションにおけるライブラリーの複雑さについてはDaley & Smith 2013 (doi: 10.1038/nmeth.2375)に情報が 있습니다。

LA2: myBaitsロングインサートプロトコルクイックガイド

1. 反応ごとに、ターゲット種に応じて下記のキャプチャーミックスを調製します（ピペットエラーは調整済みです）

MOST TAXA		PLANTS		SALMONIDS	
Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction	Component	μL / Reaction
Hyb N	9.25	Hyb N	9.25	Hyb N	9.25
Hyb D	3.5	Hyb D	3.5	Hyb D	3.5
Hyb S	0.5	Hyb S	0.5	Hyb S	0.5
Hyb R	1.25	Hyb R	1.25	Hyb R	1.25
Block O	2.5	Block O	5.0	Block O	-
Block C	2.5	Block C	-	Block C	2.5
Block X	0.5	Block X	0.5	Block X	0.5
NF Water	-	NF Water	-	NF Water	2.5
Baits	5.5	Baits	5.5	Baits	5.5
TOTAL	25.5	TOTAL	25.5	TOTAL	25.5

2. キャプチャー反応ごとに、**23 μL** のキャプチャーミックスをチューブに分注します。
3. それぞれのキャプチャーミックスに **7 μL** のそれぞれのあるいはプールしたライブラリーを加えます。
4. 60°Cのサーマルサイクラーで 10 分間反応溶液をインキュベートしたのち、95°Cで 10 分間インキュベートし、ハイブリダイズ温度まで 1 秒に 0.1°Cずつ下げます。**ヒートリッドにしてください。**ハイブリダイズ温度で 16-24 時間インキュベートします。
5. **9.を行う 1.5 時間前に** 400 μL の HybS と 39.6 mL の NF 水と 10 mL の Wash Buffer を 50 mL チューブで混合し、Wash Buffer X を作成します。ボルテックスで完全に混合し、ハイブリダイズ温度で少なくとも 45分間加熱します。
6. 1 反応あたり 30 μL のビーズを 200 μL の Binding Buffer で 3 回洗浄し準備しておきます。70 μL の Binding Buffer でビーズを再懸濁し、少なくとも 2 分間ハイブリダイズ温度で加熱します。
7. 加熱したビーズとハイブリダイズ反応物を混合し、ハイブリダイズ温度で 5 分間インキュベートします。2.5 分経過したら懸濁します。
8. ビーズをペレット化し、上清を除去します。洗浄にマイクロ遠心チューブを使用する場合、375 μL の加熱した Wash Buffer X で 3 回洗浄し、ハイブリダイズ温度で 5 分間インキュベートします。0.2 mL チューブを使用する場合 180 μL で 4 回洗浄します。
9. 30 μL の Buffer E でビーズを再懸濁し、このうち 15 μL を KAPA® HiFi あるいは NEB Ultra II Q5 polymerase システムでの 50 μL の系で増幅反応に使用します。その他のポリメラーゼシステムを使用する場合、ビーズ懸濁液を 95°Cで 5 分間インキュベートし、すぐにビーズをペレット化し、15 μL の上清を 50 μL の系で増幅反応に使用します。
10. 増幅反応物をシリカカラムかSPRIビーズで精製します。**ビーズが増幅反応物に含まれていた場合、ビーズをペレット化し、上清のみを用いてシリカカラムで精製してください。**濃縮されたライブラリーを定量し、品質チェックを行い、シーケンシングを行います。