

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
（総合）分担研究報告書

次世代シーケンサーに関わる各種検査法の開発

研究分担者 岩本 朋忠 神戸市健康科学研究所

研究協力者 地方衛生研究所ゲノム解析ワーキンググループ

研究要旨

地衛研でのゲノム解析の普及を促すため、地衛研全国 6 支部をカバーするゲノムワーキンググループメンバー（グループ長 岩本）を組織して、ゲノム解析のウェットラボ操作に関するマニュアル作成に取り組んだ。令和 6 年度は「地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編」を作成し、地方衛生研究所全国協議会ホームページ上に掲載した。令和 7 年度は、本マニュアルの普及に向けた研修の実施、さらには、エンテロウイルスゲノムを 2 セットの PCR 増幅でカバーできゲノム解析プロトコルを作成した。A, B, D 種のエンテロウイルスに対応するものである。

A. 研究目的

ゲノム解析の 1 次処理にあたるウェットラボ操作に関するマニュアル、プロトコルを作成し、全国の地方衛生研究所（地衛研）への普及を通じて、地衛研におけるゲノム解析能力の向上に寄与する。

B. 研究方法

地衛研全国 6 支部をカバーするゲノムワーキンググループ（GWG）を構成し、合議制で地衛研の体制に即した検査マニュアル・プロトコルの作成を進めた。ワーキンググループメンバー構成は、令和 6 年度は 16 施設から 16 名、令和 7 年度は 15 施設から 17 名であった。令和 6 年度、7 年度ともに、ワーキンググループ会議を各 4 回 web で開催し、アンケート調査なども併用して活動した。

令和 6 年度は、DNA ライブラリ作製マニュアルを作成することにした。マニュアルの作成にあたっては、ゲノム DNA 断片化温度と反応時間の断片化への影響とライブラリーサイズセレクション方法の違いによるリードデータへの影響について検証した。

令和 7 年度は、DNA ライブラリ作製マニュアル普及のための研修実施とエンテロウイルスゲノム解析プロトコルの作成に取り組んだ。反応条件を最適化したプロトコルについて、エンテロウイルス A 種、B 種、D 種から、それぞれ、6、12、1 種類のウイルス型を選定し、各ウイルス型から 3 株以上を抽出、合計 128 株を用いて検証実験を行った。

（倫理面への配慮）

検査手法の標準化とマニュアル化についての研究であり、個人情報など倫理面での配慮を必要とする情報や行為は一切伴わない。

C. 研究結果

I. 地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編の作成（令和 6 年度成果物）

1) マニュアル作成における課題の抽出

マニュアル作成にあたっては、ライブラリーのサイズセレクションの方法、各ライブラリーの混合比率を均質化するためのノーマ

ライゼーションのタイミング、ライブラリの濃度測定方法について意思統一が必要であることが分かった。ワーキンググループメンバー間での web 会議を繰り返し、サイズセレクションの方法については、ゲル切り出しによる方法とビーズ法の両方の手法を併記し、それぞれの特徴を記載することとした。ノーマライゼーションは、ライブラリ調整に使用する DNA 濃度を均一化 (20 ng/uL) することとした。濃度測定法は、Qubit Fluorometer を用いた方法に統一し、定量的 PCR 法をトラブルシューティングのための方法として記載することとした。

2) ゲノム DNA のフラグメンテーション処理時間と Lid 温度の影響

断片化は反応時間 3 分で十分進行することが確認できた。地衛研では様々な機種のサーマルサイクラーが使用されており、リッド(ふた)の温度調節が出来ない機種への対応が求められる。本研究での検証実験の結果、リッド温度を調節可能なサーマルサイクラーの場合は 80℃、調節できないサーマルサイクラーの場合は、32℃での断片化処理反応中、リッドを開放して、65℃のステップになってからリッドを閉めるという操作を推奨することとした。

3) ライブラリサイズセレクション方法の違いによるリードデータへの影響

リードデータの品質とデータ量確保に大きく影響するライブラリのサイズセレクションについては、磁性ビーズによる方法とゲル切り出しによる方法を比較した。その結果、ビーズ精製は簡便な手法ではあるが、170 サイクル付近からのクオリティが大きく低下することが分かった。その原因として、インサートサイズが短いライブラリが多く混入することによるものと考えられた。一方、ゲル切り出しの場合は、手間のかかる方法ではあるが、ライブラリーサイズはほぼ均質化しており、インサートサイズも想定通りの物が得られることから、リードデータとして無駄になる部分が少なく、ビーズ精製に比べてより多くのデータ量を確保できることを確認した。この検証結果をも

とにして、マニュアル中では、両者の比較データを **appendix** として提示し、フラグメント解析が可能な施設においてはビーズ精製も可能ではあるが、それ以外の施設はゲル切り出しによる方法を推奨すると明記することにした。

II. 地衛研ゲノム DNA ライブラリ作成マニュアル普及のための研修

マニュアル内容説明会を、地衛研 Web セミナーとして行った (2025 年 4 月 24 日開催。参加者 150 名程度)。Web セミナーについては、後日、地全協ホームページに動画を掲載し公開した。

地域保健総合推進事業中国・四国ブロック地域専門家会議において、技術研修を対面で行った (2025 年 10 月 16, 17 日)。中国・四国ブロックに属する 10 施設から合計 12 名が参加した。研修 1 日目は座学と大腸菌 ATCC25922 株の DNA 抽出を行った。2 日目はゲル切り出し練習を含めて、ライブラリ作製とイルミナシーケンサーのランまでを実際に行った。

III. エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコルの作成 (令和 7 年度成果物)

Mrie-Line Joffret 等が報告した手法 (Front Microbiol . 2018 Sep28;9:2339.) を改良し、多施設共同検証実験を経て、エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル初版を作成した。本プロトコルの特徴は、2 セットの PCR プライマーでエンテロウイルスのゲノム配列の全長を増幅できる点にある。また、試薬の組み合わせを検討したことから、非特異増幅を抑えることに成功した。さらに、A 種、B 種、D 種のエンテロウイルスに対応したプライマーセットを提示することで、幅広い型のエンテロウイルスを対応可能にした。

プロトコルの有用性を検証するために、エンテロウイルス A 種、B 種、D 種から、それぞれ、6、12、1 種類のウイルス型を選定し、合計 128 株を用いて、PCR 増幅の有無を確認した。検証作業は、GWG メンバー 8 施設で行った。フラグメント 1 はいずれの施設でも増幅が良好であり、128 株中 122 株

(95.3%)で良好な増幅が認められた。一方、フラグメント2では、増幅不良が散見され良好な増幅が認められたのは、128株中88株(68.8%)であった。特に、施設Aでは12検体中11件、施設Fでは21検体中11件が増幅不良であり、増幅不良が特に顕著であった。

D. 考察

地衛研全国6支部をカバーする検査実務者によるゲノム解析ワーキンググループを組織することで、各地衛研の実情に即したマニュアル(地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編)とプロトコル(エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル)が作成できた。地衛研内でのゲノム解析手法の標準化に大きく寄与するものである。定期的な会議とアンケートの実施を通じて、ワーキンググループ間での情報共有、意見交換を活発に行い課題に取り組んだ成果と言える。また、web セミナーや実地での技術研修を企画・実行し、今後の地衛研連携や人材育成の在り方を示すモデルケースにもなった。

マニュアル、プロトコルの作成においては、可能な限り、記載内容の妥当性を実験的に確認した。検証結果を appendix として提示したり、解析成功のための注釈を加えるなど、内容の充実と記載内容の信頼性を示す工夫をした。特に、GWG メンバー複数施設で検証作業を実施できた利点は大きい。施設による保有機種の違いに対する選択肢の提示にもつながり、全国に80か所以上存在する地衛研のニーズに即したマニュアル、プロトコル作成が実現した大きな要因である。

一方で、GWG メンバー間での役割分担は必ずしも均質ではなく、特定の施設への過度な負担につながったことは、今後の課題である。今回、2年間の活動においては、具体的な目標を定めずに、まず GWG を組織し、メンバー間での議論駆動型で課題を見出し、マニュアル・プロトコルづくりを遂行するというプロセスを経たために、メンバー間での役割分担が後付けで決定したことを考えると役割分担の不均質は、やむおえ

ない結果ではある。今後、同様のワーキンググループを立ち上げる場合には、まず、課題を明確化したうえで、グループメンバーの選定を行うことで、よりスムーズなプロジェクトの遂行が可能になるものと思われる。

E. 結論

生物種にかかわらず、ゲノム解析の基盤プラットフォームとなるマニュアル「地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編」を令和6年度に作成した。さらに、令和7年度には、エンテロウイルスA種、B種、D種の幅広いウイルス型の全ゲノム解析を可能とするプロトコル「エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル初版」を作成した。地衛研全国6支部をカバーする検査実務者によるゲノム解析ワーキンググループメンバーで取り組んだ成果であり、施設による保有機種の違いも考慮した、地衛研のニーズに即したマニュアルとプロトコルである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- ・地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編
- ・エンテロウイルスゲノム解析プロトコル初版 (Ver.05)。

地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル

QIAseq FX DNA Library kit 編

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

* 本マニュアルの内容に関する質問、問い合わせは、下記のゲノム解析ワーキンググループメーリングリスト宛にお願いします。

genome_working_group-ml-bounces ¥ chieiken.gr.jp

(¥を@に変更してください)

* 本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

- ・初版作成（2025 年 3 月 19 日）

ゲノム DNA ライブラリ作製手順の概要

Fragmentation

(ゲノム DNA の断片化処理)



Adapter ligation

(各サンプルへのインデックスとアダプターの付与)



Clean up and Elution

(ライゲーション後の溶液の精製)



Library amplification

(ライブラリの PCR 増幅)



Library size selection

本マニュアルでは、磁性ビーズによる方法とアガロースゲル電気泳動ゲル切り出しによる方法を併記した。



ライブラリの定量、モル濃度計算



ライブラリ変性、イルミナシーケンサーのラン

1. 試薬・装置

試薬等 消耗品

- DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)等 同等品
- QIAseq FX DNA Library Kit 各種 (QIAGEN : 180475 等)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher : Q32854 等)
- Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) 同等品
- Illumina 社 シーケンシングキット (300-cycle 以上可能なものを推奨)
- QIAGEN 社 Buffer EB
- 80%エタノール溶液 (用時調整)
- 低吸着性エッペンチューブ (1.5 ml)
- 100 mg/mL RNase A (ニッポンジーン) 同等品
- アガロース S (ニッポンジーン) 等 同等品
- ×10,000 GelRed (ニッポンジーン) 等 同等品
- 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) 等 同等品
- ×1 TAE buffer : 用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)
- QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) 等 同等品
- 3M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.0)
- イソプロパノール

器具・機器等

- Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher)
- Illumina 社シーケンサー
- PCR Thermal Cycler 各種 (ヒートリッドの温度制御可能なものが望ましい)
- AMPure XP 精製用磁石スタンド (Fast Gene Magna Stand 等)
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機 (スピンドウン用)
- 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- 電気泳動装置 : MupidR-exU (株式会社ミューピッド) あるいは同等品
- LED トランスイルミネーター : FAS-V (日本ジェネティクス) あるいは同等品
- その他基本的な実験器具類

2. ゲノム DNA 抽出

2-1. ゲノム DNA 抽出 (細菌)

菌種に応じた適切な培養条件で培養した菌体についてゲノム DNA を抽出する。一例として、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を使用した方法を紹介する。

1. 純培養した菌体を回収し 180 μ L の Buffer ATL でペレットを再懸濁する (グラム陽性菌の場合は前処理で菌体溶解のために追加のステップが必要となる。詳細はキットのマニュアルを参照)。
2. Proteinase K 20 μ l を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56°C でインキュベートする (1 時間～一晩)。
3. 4 μ L の RNase A (100 mg/ml) を添加しボルテックス操作で混和、室温 (15 ~ 25°C) で 2 分間インキュベートする。
4. 15 秒間ボルテックス混和する。200 μ l の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。200 μ L のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分に混和する。
5. 混合液 (形成した沈殿物を含む) を、キットに添付されている新しい 2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW1 を添加後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW2 を添加後、20,000 x g (14,000 rpm) で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
8. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50~100 μ L の Buffer EB を DNeasy メンブレン上に添加する。室温 (15~25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、ゲノム DNA を溶出する。

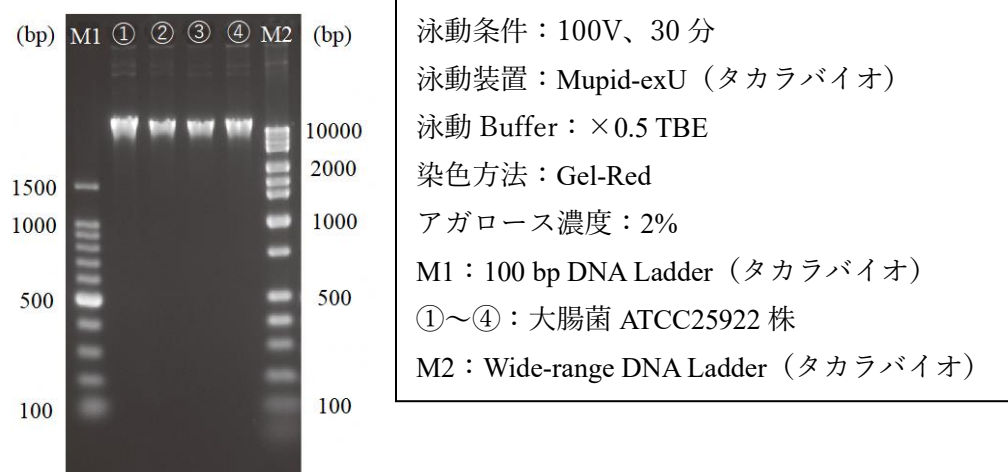
【ゲノム DNA の品質評価】

- ・アガロースゲル電気泳動で主に 10 kbp 以上の高分子DNA が観察されること（下図参照）

オプション

NanoDrop 等の分光光度計での吸光度測定が可能であれば、A260/A280 が 1.7 以上であることを確認するとよい。ただし、A260 から換算した DNA 濃度は後述の Qubit による測定結果とは一致しないことが多い。DNA 濃度調製は、Qubit 等の蛍光色素を用いて二本鎖 DNA 濃度を正確に定量可能な機器の測定結果を元にすること。ただし、本マニュアルは Qubit を使用した検討結果に基づいており、Qubit 以外の蛍光試薬を用いる場合は濃度設定について事前に検討することを推奨する。

（参考図 大腸菌 ATCC25922 株 DNA のアガロースゲル電気泳動例）



2-2. DNA 濃度測定

Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って濃度測定を行う。Qubit での測定範囲外（Out of range）となった場合は適宜希釈して再測定する。ゲノム DNA は、Buffer EB（QIAGEN）で 20 ng/μL に希釈し、ライブラリ作製に用いる。

【注釈】 メーカー使用説明書では、Qubit 試薬は 6 ヶ月間安定と記載されている。

操作例：

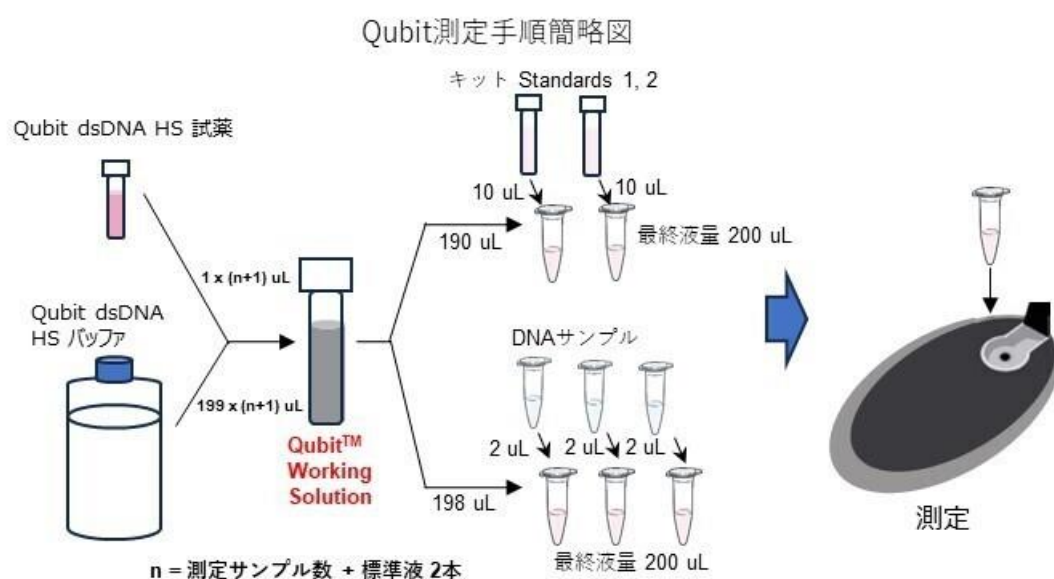
【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit （Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube （Thermo Fisher Scientific）

【手順】

- ・ 下図（Qubit 測定手順簡略図）を参考に、標準液（standard #1, standard #2）と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。検体数を n として、Qubit Reagent $n+2$ μL 、Quant-IT Bufer $199 \times (n+2)$ μL を混合する。
- ・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μL を分注する。
- ・ Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 μL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。
- ・ DNA サンプル 2 μL に Qubit working solution 198 μL を加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。



（サーモフィッシャー社 Qubit 2.0 Fluorometer カタログを参考に作図）

3. ライブラリ作製

QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)

*本マニュアルでは、キットのプロトコルの 1/2 スケールで実施する。

* Clean up and Elution を除く全ての作業を氷上のアルミブロック上で実施する。

※検体数が多い場合は全ての作業について、各マスターミックスや AMPure Beads を 8 連チューブに必要量分注しておき、8 連ピペットを用いて反応チューブに分注・ピペッティングするとサンプル間の時間差や試薬の入れ忘れ、コンタミネーションのリスクが軽減できる。

注意点

本製品は各アダプターが使いきりであり、アルミプレートシールで封をされた 96well プレートに入っている。本プロトコルは 1/2 スケールで実施する関係上、アダプター全量を使用しないため、一度解凍して 8 連チューブなど別の容器に移して再凍結保存 (-20℃以下) しておき、必要分だけ取り出して使用することを推奨する。ただし、飛沫によるアダプター同士の交差汚染を防ぐため 96well プレートの遠心操作は必須であり、また、アルミプレートを剥がす場合は交差汚染の防止に細心の注意を払うこと。

3-1. Fragmentation (ゲノム DNA の断片化処理)

- ・ サンプル分の 0.2 mL PCR チューブ もしくは 96 well PCR プレートを用意
- ・ 下記の Fragmentation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるように調製する。

試薬	容量 (1 検体あたり)
Nucleotide Free Water	15.0 μL
Fx Buffer, x10	2.5 μL
Fx Enzyme Mix	5.0 μL
Total	22.5 μL

※調製後のマスターミックスはボルテックス厳禁

- ・ マスターミックスを 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する。
- ・ 20 ng/μL に調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、8 連ピペットの目盛りを 10 μL に設定して 10 回以上ピペッティングする
- ・ スピンドウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

4°C	1 min
32°C	3 min
65°C	30 min
4°C	1 min

※ ヒートリッド温度が変更可能な機種であれば 80°C に設定する（注釈参照）

※ 試薬調整前にプログラムを開始し、4°C で pause しておくとい

- ・ 反応終了後、すぐに PCR チューブをスピンドウンし氷上のアルミブロック上に置く。

注釈

QIAGEN のマニュアルではヒートリッド温度は 70°C と記載されている。これはヒートリッドが高温の場合、32°C の Fragmentation の工程に影響が出るためであるが、本プロトコルでは SARS-CoV-2 のゲノム解析マニュアルの記載に倣い 80°C とした。リッド温度が変更できない機種の場合は、32°C 反応中、リッド(蓋)を開放して、65°C のステップになってからリッドを閉めることを推奨する。また、リッド温度を 70°C~105°C 設定で反応させた場合の断片化の経時変化を巻末に参考データとして記載している（Appendix 図 1、2）。

3-2. Adapter Ligation（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	7.5 μL
DNA Ligation Buffer, x5	10.0 μL
DNA Ligase	5.0 μL
Total	22.5 μL

- ・ 上記 Ligation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるよう調製し、新しい 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する
- ・ 対応するアダプターを 2.5 μL 加え、数回ピペッティング
- ・ Fragmentation 後の DNA を全量（25 μL）加え、ピペッティング（20 回以上）で十分混和する。

- ・ スピンドアウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

20°C	15 min
------	--------

※ヒートリッドは 20°C、もしくは開放する

※試薬調整前にプログラムを開始し、20°C で pause しておくとい

- ・ 反応中に Agencourt AMPure XP beads を冷蔵庫から室温に出しておく

注意点

DNA Ligation Buffer は非常に粘性が高い液体のため、以下の手順で十分に Mixture を混合することを推奨する。これらの混合が不十分の場合はライブラリの質が低下する。

- ・ Nucleotide Free Water と DNA Ligation Buffer, x5 を混合後、ボルテックスで十分混合した後、Ligase を加えてタッピングあるいはピペッティングで混合し Ligation マスターミックスとして使用する。

3-3. Clean up and Elution (磁性ビーズ精製 2 回による、未反応アダプター等の除去)

(用意するもの)

Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)

80%エタノール (用時調製)

0.2 mL チューブ用マグネットスタンド (日本ジェネティクス社など)

- ・ AMPure Beads を室温に戻しておく。

< 1 回目の精製 >

- ・ AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和し、底部に沈んでいる磁気ビーズを均一化させる。
- ・ AMPure Beads を 40 μ L (0.8 倍量) ずつ加え、ピペッティングで混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間程度 (上清がクリアになるまで) 静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μ L の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間程度静置し、ビーズを乾燥させる (乾燥させすぎ注意)。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。
- ・ チューブをマグネットスタンドから取り出し、25 μ L の buffer EB を加える。
- ・ ピペッティング後、スピンドウンする。

※この過程のビーズは固まりやすく、分散しづらいのでよくピペッティングすること。

- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。

< 2 回目の精製 >

- ・ AMPure Beads をボルテックスで十分混和する。
- ・ AMPure Beads を 27.5 μ L (1.1 倍量) ずつ、回収した上清に加え、混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間程度 (上清がクリアになるまで) 静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μ L の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。
- ・ チューブをマグネットスタンドから取り出し、13 μ L の buffer EB を加える。
- ・ ピペッティング後、スピンドウンする。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を 11.75 μ L 回収する。

3-4. Library Amplification (ライブラリの PCR 増幅)

試薬	容量 (1 検体あたり)
Primer Mix (10 μ M each)	0.75 μ L
Hi-Fi PCR マスターミックス, x2	12.5 μ L
Total	13.25 μ L

- ・ 上記 PCR マスターミックスをサンプル数 + α 反応分調製し、転倒混和後スピンドウン。
- ・ 13.25 μ l を Clean up and Elution で溶出したサンプル(11.75 μ L)に添加しピペッティングで混和する。
- ・ スピンドウン後サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う。

98°C	2 min
6 cycles of	
98°C	20 sec
60°C	30 sec
72°C	30 sec
↓	
72°C	1 min

【注釈】 この工程を終えた検体について、-20°C保存可能である。

4. ライブラリサイズセレクション

ライブラリの精製およびサイズセレクションはその後の Run の結果に大きく影響する。本マニュアルではアガロースゲル電気泳動後のゲル切り出しによる精製方法と、キットの公式プロトコルに準じた磁性ビーズによる精製方法を記載する。

なお、本工程では既に Index による各サンプルの標識が完了しているので、複数サンプルをプールして実行しても良い。ただし、その際は各個別サンプルの濃度やクオリティについては検証不可となるので注意が必要である。

注釈

それぞれの精製方法によって得られたリードデータの質や、注意点などについては巻末の Appendix で解説しているのでどちらの手法を採用するか参考にしていただきたい。ただし、磁性ビーズを使用した精製方法では Bioanalyzer や MultiNA、TapeStation 等の、キャピラリー電気泳動装置のスミア解析機能によるライブラリサイズの把握が必要となるため、それらの装置を保有していない施設ではゲル切り出しによる精製方法を選択することを推奨する。

4-1. 電気泳動によるゲル切り出し (4-2 ビーズ精製を選択する場合は不要)

(用意するもの)

- ・ ゲル切り出し用トランスイルミネーター：BLoK LED Transilluminator (GeneDireX) 等 同等品 (DNA 損傷の観点から UV イルミネーターは非推奨)
- ・ アガロース S (ニッポンジーン) 等 同等品
- ・ ×10,000 GelRed (ニッポンジーン) 等 同等品
- ・ 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) 等 同等品
- ・ ×1 TAE buffer：用時調製
- ・ FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)
- ・ QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) 等 同等品
- ・ イソプロパノール

(ゲルの作成方法)

* 状況によっては泳動する溶液量が多いため、厚めのゲルを作製するとよい。ゲルが厚いと後染めでは染まりにくいので、染色方法は先染めを推奨する。

- ・ ×1 TAE buffer と 1%重量のアガロースを混合する。
- ・ 電子レンジで溶解する。
- ・ 50°Cの恒温水槽で保温する。
- ・ 1/10,000 量の×10,000 Gel Red を混合する。
- ・ コームを立てたゲルメーカーに流し、固まるまで待つ。
- ・ 冷蔵庫で十分冷却して、ゲルを完全に固化させる。
- ・ コームを外し、保湿して保存する。 ※用事調製する。

(PCR 産物の泳動)

- ・ PCR 反応後の各サンプル (25 μ L) に $\times 6$ Loading Buffer を 5 μ L 加える。
- ・ 各ウェルにアプライする。
- ・ 両サイドのマーカーレーンに 100bp DNA Ladder を 15 μ L アプライする。
- ・ 100 V、30 分間程度泳動する。
- ・ ブルーライトのイルミネーター上で泳動像を確認する。
- ・ 500-600bp のサイズを切り出し、2 mL マイクロチューブに回収する。

(FastGene アガロース ゲルバンドカッターを用いるとよい)

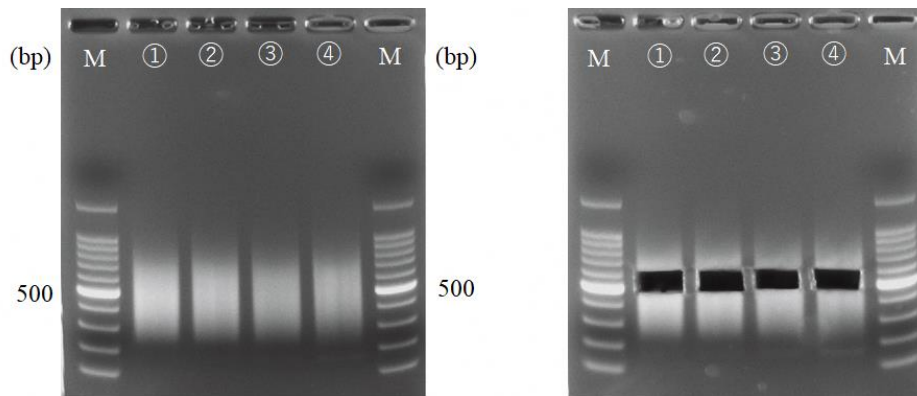
注釈

※複数サンプルをプールする場合は、例えば全量を 36 μ L となるようにし、 $\times 10$ Loading Buffer を 4 μ L 加えてから各ウェルにアプライすること。

(QIAquick Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出)

- ・ 切り出したゲルスライスの重量を測定する。
- ・ 測定した重量の mg を μ L と見立て、3 倍量の Buffer QG を加えてボルテックスする。
- ・ 50°C のヒートブロック上で時折ボルテックスしながら 10 分間溶解する。
- ・ 溶液の色がオレンジ色、あるいは紫色となった場合は 3M 酢酸ナトリウム水溶液を 10 μ L 加えてボルテックスする。
- ・ ゲル重量と同量のイソプロパノールを加えてボルテックスする。
- ・ QIAquick カラムに溶解したサンプルを入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ Buffer QG を 500 μ L 入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ Buffer PE を 750 μ L 入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ カラムに何も入れないまま遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、1.5mL のマイクロチューブを取り付ける。
- ・ メンブレンの中央に 30 μ L の Buffer EB を添加し、1 分間静置する。
- ・ 遠心してマイクロチューブ内に溶出された DNA を回収する。
- ・ 完成したライブラリーは、-30°C で 1 ケ月程度保存可能

(参考図 大腸菌 ATCC25922 株における切り出し前後のゲル画像例)



左：切り出し前 右：切り出し後

ライブラリ調製キット：QIAseq FX DNA Library UDI-A Kit

泳動条件：100V、30 分 泳動装置：Mupid-exU (タカラバイオ)

泳動 Buffer：×1 TAE アガロース濃度：1% #Gel-Red 先染め

切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator (GeneDireX)

ゲルカッター：FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)

M：100 bp DNA Ladder (タカラバイオ)

①～④：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

4-2. ビーズ精製 (4-1. 電気泳動によるゲル切り出しを選択した場合は不要)

Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) 等 同等品

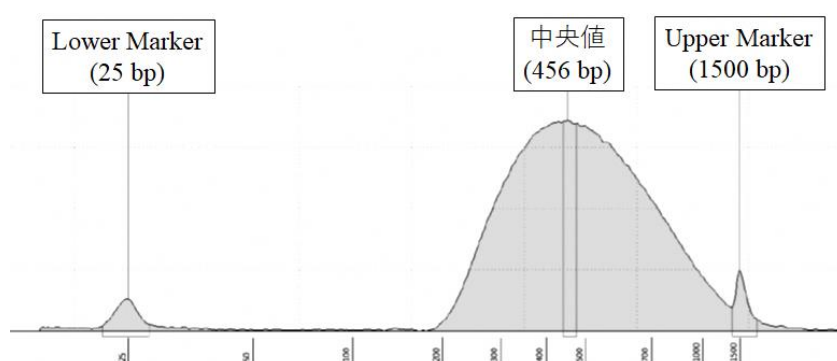
80%エタノール (用時調製)

0.2 ml チューブ用マグネットスタンド (日本ジェネティクス社など)

- ・ AMPure Beads を室温に戻しておく。
- ・ AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和する。
- ・ AMPure Beads を 30 μ L (1.1 倍量) ずつ加え、ピペッティングで混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し上清が清澄化するまで 2 分間程度静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μ L の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

- ・チューブをマグネットスタンドから取り出し、30 μ L の buffer EB を加える。
- ・ピペッティング後、スピンドウンする。
- ・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。
- ・Bioanalyzer や MultiNA 等のキャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によりライブラリサイズの分布を確認し、中央値を控えておく。
- ・完成したライブラリーは、-30°Cで 1 ヶ月程度保存可能

(参考図 ビーズ精製後のスメア解析例)



使用機種：Agilent 2200 TapeStation (アジレント・テクノロジー)
 使用キット：High Sensitivity D1000
 分析サンプル：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

5. ライブラリ定量

5-1. Qubit によるライブラリ DNA 濃度測定

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

Qubit Assay Tube (Thermo Fisher Scientific)

【手順】

- ・ 本マニュアル 7 ページの Qubit 測定手順間略図を参考に、標準液 (standard #1, standard #2) と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。
- ・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μ L を加える。
- ・ Qubit DNA HS Standard #1, #2 10 μ L を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。
- ・ 精製後の DNA ライブラリ 2 μ L に Qubit working solution を 198 μ L 加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。
- ・ 後述「ライブラリのモル濃度計算式」を用いてライブラリモル濃度を算出する。
- ・ Buffer EB (QIAGEN) で 4 nM となるように希釈する。

ライブラリのモル濃度計算式

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/}\mu\text{L)} \times 1,000,000\}}{\{\text{ライブラリの平均サイズ (bp)} \times 660\}}$$

例 1 : 500-600bp の範囲でゲル切り出しを行った場合

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/}\mu\text{L)} \times 1,000,000\}}{\{550 \text{ (bp)} \times 660\}}$$

例 2 : ビーズ精製後、スメア解析の中央値が 400bp だった場合

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/}\mu\text{L)} \times 1,000,000\}}{\{400 \text{ (bp)} \times 660\}}$$

注釈

算出されたライブラリモル濃度が 4nM に満たない場合は、2nM になるように Buffer EB で希釈し、「6. ライブラリ変性等 Run 関係 : MiSeq での Run 時の変性・希釈作業」において 2nM を初期値とした手順に移ることが可能である。ただし、その場合は、同時に Run する全ての検体を 2nM に希釈する必要がある。

5-2. qPCR 法による定量（通常は行わない）

注釈

Qubit での定量値で想定通りのデータが得られなかった場合、より精度の高い定量法である qPCR 法での定量を行い、原因を推定する。qPCR 法としては、イルミナシーケンサーで用いられている P5、P7 配列をターゲットとした市販のキットが複数販売されている。本マニュアルでは、Itokawa らの qPCR 法によるライブラリ定量法を掲載する（5-2 参照）。

<https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-6qpvrddpzgmk/v1>

UltraPure[®]; Salmon Sperm DNA Solution Thermo Fisher #15632011

PhiX Control v3 Illumina, Inc. #FC-110-3001

PrimeTime[®] Gene Expression マスターミックス Integrated DNA Technologies #1055770

- ・ Salmon sperm DNA を 5 ng/μL に調整する。

試薬	容量 (μL)
Nucleotide Free Water	9,889
1 M Tris-HCl, pH 8.0	100
0.5 M EDTA	10
UltraPure DNA Solution 10 mg/ml	5
Total	10 mL

- ・ 上記 Salmon sperm DNA (5 ng/μL) を使用し、PhiX コントロールの希釈系列を作成する。

50 pM	100 μL
5 pM	100 μL
0.5 pM	100 μL
0.05 pM	100 μL

- ・ Primer & Probe Mix (20x) を調製する。

Probe	5 nM
P5 primer	5 nM
P7 primer	5 nM

Double-quenched probe (IDT) :

/56-FAM/ACACTCTTT/ZEN/CCCTACACGACGCTCTTC/3IABkFQ/

P5 primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

P7 primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'

- ・ ライブラリを Buffer EB で 100 倍または 1,000 倍に希釈しておく。

・ qPCR

試薬	容量 (μL ; 1 検体あたり)
Prime Time PCR マスターミックス	10
20x primer & probe mix	1
Nucleotide Free Water	8
希釈ライブラリ or 希釈 PhiX コントロール	1
Total	20 μl

95°C	2 min
30 cycles of	
97°C	5 sec
62°C	10 sec
68°C	15 sec

- ・ 得られた結果からライブラリのモル濃度 (nM) を算出する。

6. ライブラリ変性等 Run 関係

MiSeq のカートリッジは V2 と V3 で推奨のアプライ濃度が異なる。iSeq 100 も含めた各カートリッジの推奨濃度は下記の通りである。

- MiSeq Reagent kit V2: 10 pM からはじめ、クラスター密度を 1000-1200 K/mm² になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- MiSeq Reagent kit V3: 12 pM から始めて、1200-1400 K/mm² になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- iSeq 100 il Reagent v2: 50~100 pM (変性作業無し) で occupancy が 80~90% を目指して最適化を行ってゆくのが良い。

MiSeq での Run 時の変性・希釈作業

- ・ 氷を用意しておき、HT1 バッファーとアルミブロックを冷やしておく。
- ・ 4 本の 1.5 ml チューブを用意、それぞれ以下の用途に使用する。

各ライブラリを 4 nM に希釈した場合 (推奨)

- チューブ[N]: 0.2 N NaOH 調製用 (Nuclease-Free Water 800 μ L と 1N NaOH 200 μ L を混合)
 - チューブ①: 1 次希釈用
 - チューブ②: 2 次希釈用 (HT1 バッファー 990 μ L を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
 - チューブ③: 3 次希釈用 (HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
-
- ・ チューブ①に ライブラリ溶液を 5 μ L 入れておく。
 - ・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 5 μ L を チューブ① に加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ スピンドアウンする。
 - ・ 室温で 5 分間インキュベーション (変性) 後すぐに 2 次希釈へ進める。
 - ・ 1 次希釈後のライブラリ溶液 (チューブ①) 全量 10 μ L を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
 - ・ Vortex でよく混ぜ (10 秒)、3 次希釈へ進める。
 - ・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ チューブ③から 630 μ L を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。
- 上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/200 まで希釈される (4 nM→20 pM)。
チューブ③が計 1000 μ L となるように Run したい最終濃度に希釈する (最終を 15pM としたいのであれば、②:750 μ L + HT1: 250 μ L)。

各ライブラリを 2 nM に希釈した場合

- チューブ[N]: 0.2 N NaOH 調製用 (Nuclease-Free Water 800 μ L と 1N NaOH 200 μ L を混合)
 - チューブ①: 1 次希釈用
 - チューブ②: 2 次希釈用 (HT1 バッファー 980 μ L を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
 - チューブ③: 3 次希釈用 (HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
-
- ・ チューブ①に ライブラリ溶液を 10 μ L 入れておく。
 - ・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 10 μ L を チューブ① に加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ スピンダウンする。
 - ・ 室温で 5 分間インキュベーション (変性) 後すぐに 2 次希釈へ進める。
 - ・ 1 次希釈後のライブラリ溶液 (チューブ①) 全量 20 μ L を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
 - ・ Vortex でよく混ぜ (10 秒)、3 次希釈へ進める。
 - ・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ チューブ③から 630 μ L を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/100 まで希釈される (2 nM→20 pM)。チューブ③が計 1000 μ L となるように Run したい最終濃度に希釈する (最終を 15pM としたいのであれば、②:750 μ L + HT1: 250 μ L)。

注釈

サンプル濃度が高すぎるとオーバークラスターにより、リードデータが得られない場合がある。不慣れな施設は、まずは、やや低めの最終濃度で試すほうが安全である。
また、2 nM よりも低い濃度に希釈することは、2 次希釈液への NaOH の持ち込みが多くなる理由でメーカーから推奨されていない。

QIAseq FX DNA Library UDI キットを使用した際のサンプルシートの作成方法について

2025 年 3 月現在、QIAseq FX DNA Library には CDI アダプター付属の製品と Unique Dual Index (UDI) アダプター付属の製品が販売されている。このうち CDI アダプターはイルミナ純正の TruSeq キットと同一のインデックス配列であるため、イルミナ NGS に付属の Local Run Manager (LRM) の初期状態でインデックスの指定が可能である。一方で、UDI アダプターキットのインデックス配列は QIAGEN 独自の配列であるため、LRM には配列が登録されておらずサンプルシートの作成が困難である。そこで、LRM に UDI アダプターキットのインデックス配列を登録するための手法を掲載する。

- ・ 別添の 4 種類のテキストファイルを USB メモリ等の外付けドライブに保存し、イルミナ NGS (iSeq または MiSeq) に接続する。
- ・ LRM を立ち上げ、TOOLS→Library Prep kit を選択する
- ・ Add Library Prep Kit を押し、目的のテキストファイルを選択する（使用するキットによって必要に応じて A~D まで 4 回繰り返す）*通常 A キットしか使用しないという施設は A のみ登録すると間違いがなくて良い。
- ・ サンプルシート作成画面に行き、QIAseq の UDI キットが選択できるようになっていれば成功(ウェルポジション指定で自動的に R1 と R2 のインデックス配列が入力される)

ゲノム解析ワーキンググループメンバ

池田徹也	北海道立衛生研究所
瀬戸順次	山形県衛生研究所
大澤修一	茨城県衛生研究所
塚越博之	群馬県衛生環境研究所
江原勇登	埼玉県衛生研究所
久保田寛顕	東京都健康安全研究センター
中嶋直樹	神奈川県衛生研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所
鈴木雅和	愛知県衛生研究所
高橋剣一	名古屋市衛生研究所
若林友騎	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
野本竜平	神戸市健康科学研究所
平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
亀山光博	山口県環境保健センター
平井真太郎	愛媛県立衛生環境研究所
重村洋明	福岡県保健環境研究所
グループ長：地全協 精度管理部会員 神戸市健康科学研究所 岩本 朋忠	

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

厚生労働行政推進調査事業費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者 貞升 健志）

Appendix

1. Fragmentation における Lid 温度および反応時間の影響について

本マニュアル 3. ライブラリ作製の Fragmentation については、公式マニュアルでは input DNA 量の違いにより 2～30 分という記載になっている。本マニュアルでは input DNA 量を 50 ng に固定しているため、反応時間が断片化に与える影響は大きい。そのため、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、反応時間による断片化の進行具合を検証した。なお、検討は以下の試薬および機器を使用し、本マニュアルの作業手順に従って実施した。

DNA 抽出試薬：DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

キャピラリー電気泳動：Agilent 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー)

Agilent High Sensitivity DNA キット(アジレント・テクノロジー)

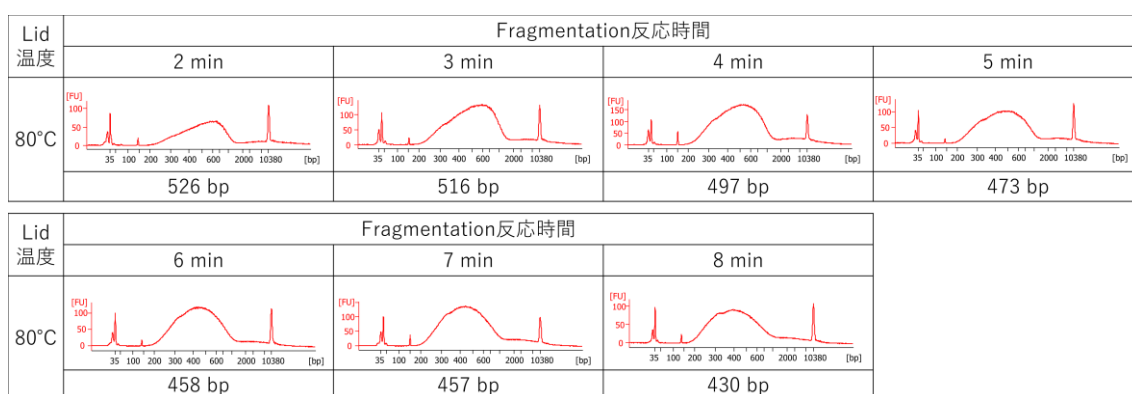


図 1. Fragmentation の反応時間における断片化の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

断片化は反応時間 3 分でも十分進行しており、ライブラリ作製に適していると考えられた。MiSeq を使用してリードデータを取得する場合、片側 250 または 300 bp となるペアエンドリードを想定するケースが多いため、少し長めの断片を残存させる条件で反応時間を設定することを推奨する。

続いて、Lid 温度が断片化に与える影響について検証した。同様に大腸菌 ATCC25922 株を用いて Lid 温度を 70℃、80℃、105℃に設定し反応を行った。105℃については Fragmentation 反応中に Lid を開放した状態と閉めた状態の 2 条件で検証を行った。その結果を図 2 に示す。70℃、80℃、105℃（開放）では断片化の進行に大きな違いは見られなかったが、105℃で閉めた場合は若干断片化の進行が早くなる傾向が認められた。しかし、その影響は軽微であり、Lid を開放した条件では他と差がないため、Lid 温度を調節可能なサーマルサイクラーを所持しない施設は参考にしていただきたい。

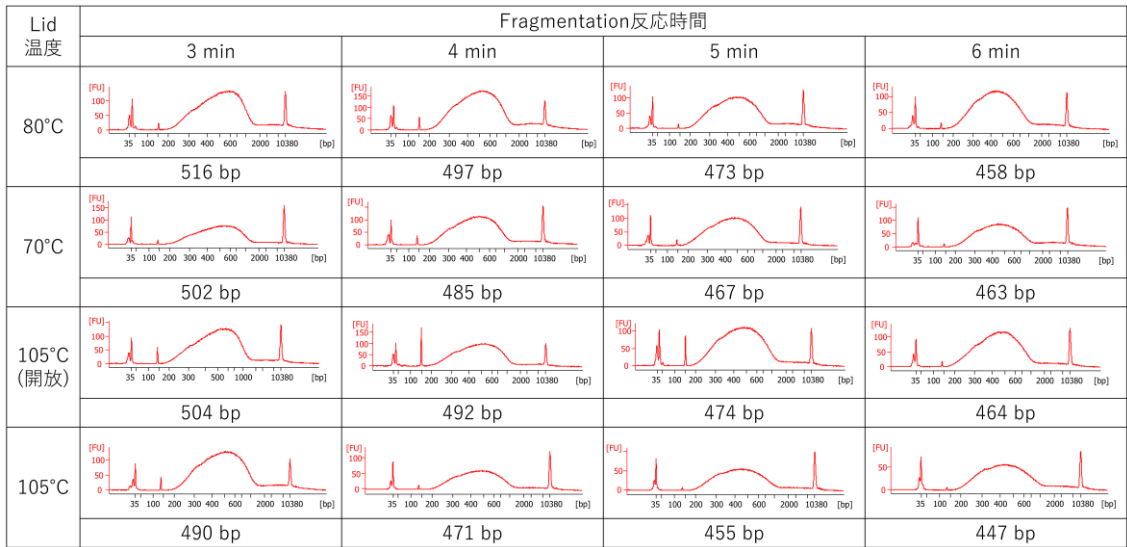


図 2. Lid 温度の違いによる Fragmentation 反応の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

2. ライブラリ精製方法の違いによるリードデータへの影響について

本マニュアル4. ライブラリのサイズセレクションの項でも述べたように、ライブラリの精製やサイズセレクションはその後の解析に影響を与える重要な工程である。キットの公式マニュアルでは磁性ビーズによる精製手法が記載されている。この手法は簡便であるが、ライブラリサイズの推定が難しい点や、ライブラリサイズがブロードに広がってしまうという難点がある。このことは、想定を大幅に逸脱したサイズのフラグメントが混ざること、クラスターの形成不全や、解析サイクルの後半部分でのリードのクオリティ低下を招くことにつながってしまう。一方で、電気泳動によるゲル抽出での精製方法は、工程としては煩雑になるものの、目的のサイズのライブラリのみを収集できるため、ライブラリサイズの推定が容易で質の良いリードデータを再現性良く取得することが可能となる。

本マニュアル作成に際し、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、ビーズ精製とゲル抽出の違いによるライブラリの状態と取得したリードデータの違いについて検証したので参考にしていただきたい。

両手法によるライブラリサイズの分布の解析結果を図3に示す。ゲル抽出精製が550bp付近で比較的シャープな山を形成しているのに対し、ビーズ精製ではアダプターダイマーやプライマーダイマーなどは見られなかったものの、山がブロードで1000 bpを超えるサイズのフラグメントも残存しているのがわかる。

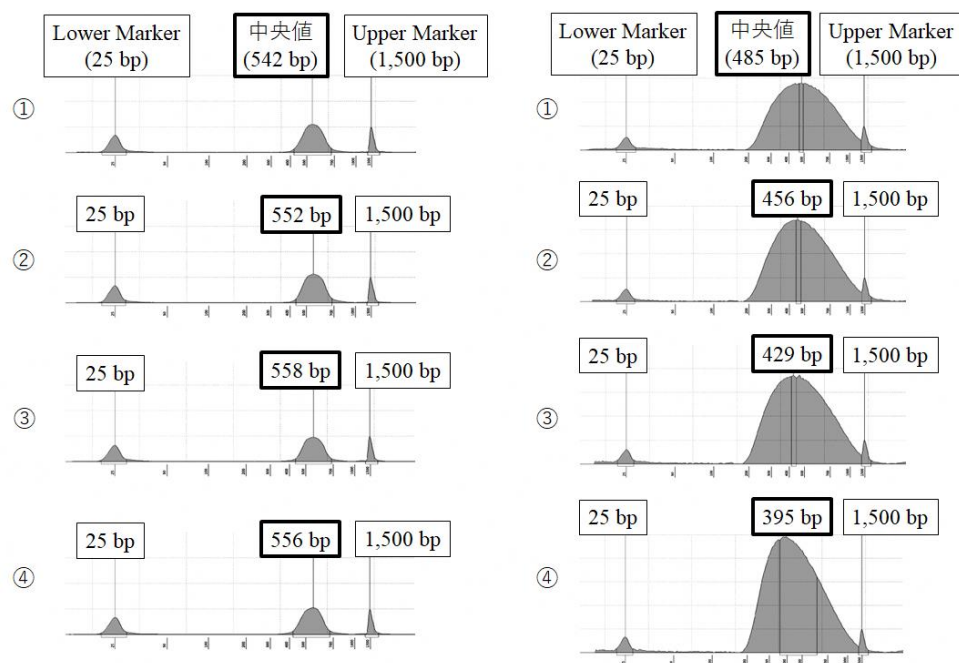


図3. ライブラリサイズの分布。ゲル抽出（左）とビーズ精製（右）を TapeStation により解析した

1000 bp を超えるフラグメントは MiSeq のクラスター形成過程において Bridge PCR がうまくいかずクラスター形成不全を引き起こす。そのため、想定したライブラリの DNA 濃度

から推定したライブラリの想定クラスター密度と実際の密度の乖離が大きくなってしまう可能性がある。

続いて、作製したライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてリードデータを取得し、fastp v0.23 によるトリミングを実施した。その結果、リード数の残存率はトリミングの前後でどちらの手法も 98%となり大きな違いはなかったが、残存した総リード長はゲル抽出が約 94%であるのに対し、ビーズ精製は約 74%しか残存せず、大きく差がついた (Table 1)。これはビーズ精製ではリードの後半部分のクオリティが急激に落ちることが原因と考えられる。

Table 1. トリミング前後でのリード数と総リード長の残存率

	残存リード数割合 (%)	残存総リード長割合 (%)
ビーズ精製	98.4	73.5
ゲル抽出精製	98.1	93.7

図 4 に示す通り、170 サイクル付近からビーズ精製のリードはクオリティの低下が確認される。これは insert size が短いリードでは反応サイクルの後半でアダプター領域以降を解析してしまうためであり、ライブラリ精製過程で短いフラグメントが残存してしまうことに起因する。

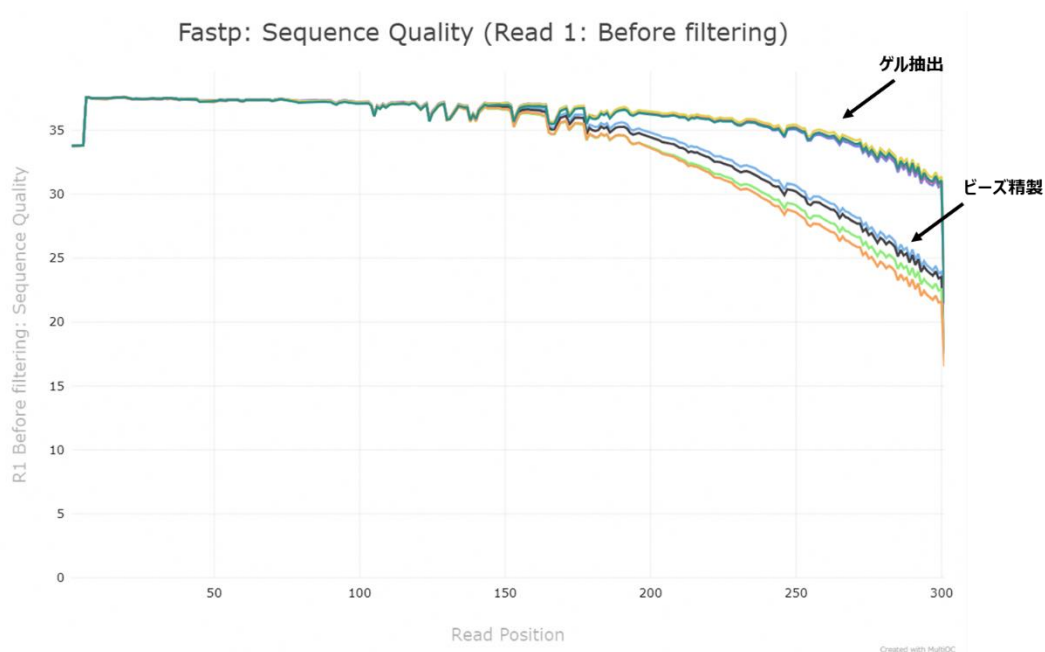


図 4. トリミング前のリードクオリティの推移。X 軸の数字は反応サイクル数と同義

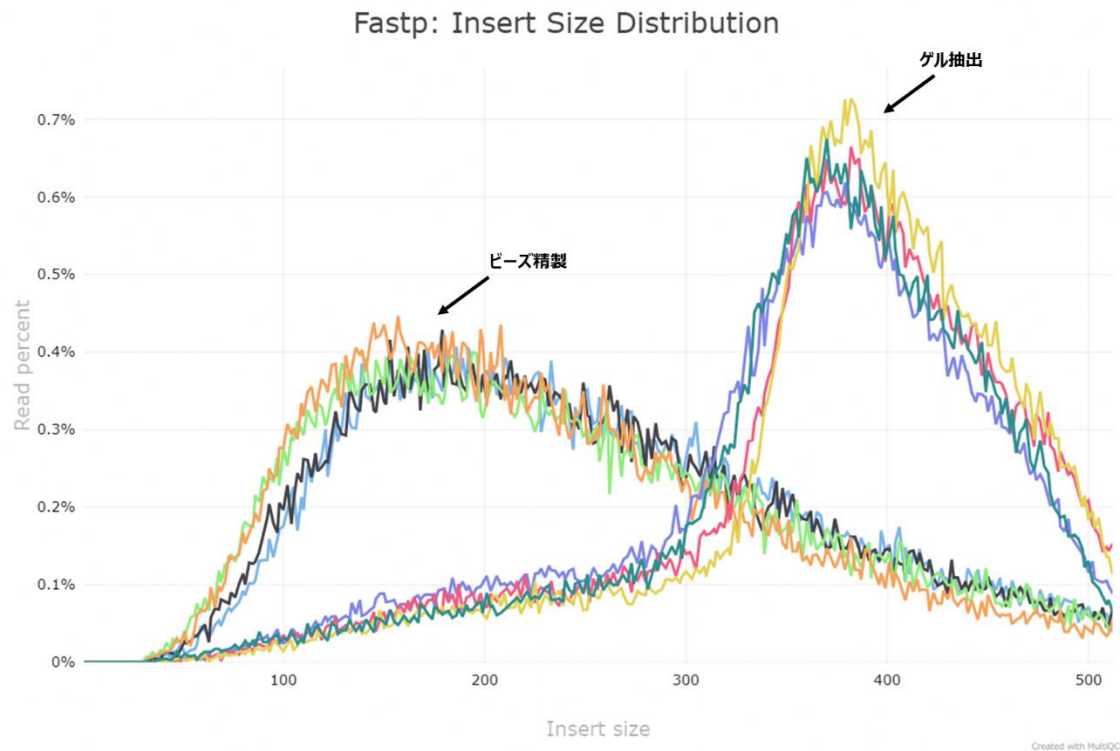


図 5. リードの Insert size の分布

またそれぞれのリードデータの Insert size の分布を図 5 に示した。ゲル抽出のピークは 380 bp 付近であるのに対し、ビーズ精製では 160 bp 付近がピークとなった。500 サイクルや 600 サイクルの Reagent kit で解析する際は短い Insert size では無駄になる部分が多いため得られたデータ量に対し、解析に使用できるデータ量の割合が少ないという問題が生じてしまう。

一方で、今回のリードデータを用いて大腸菌 ATCC25922 株の完全長配列 (Accession no. CP009072) をレファレンスとして SNVs 解析を実施したところ、取得した 8 検体間では SNV は検出されず、レファレンス配列に対しては 8 検体とも 2 SNVs が検出された。これは株の継代の際に蓄積された SNV であると考えられる。また、Assembly 結果もビーズ精製の方が若干コンティグ数が増える傾向があるが、概ねデータの差異は認められなかった。従って、ビーズ精製とゲル抽出ではインサートサイズなどの違いはあるが、SNVs 解析などでは同様の結果が得られるであろう。ビーズ精製の方がデータのロスが大きくなるため、目標とする解析に合わせて精製方法を選択するよう参考にしていただきたい。

地衛研 エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

*本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変した PCR と次世代シーケンサー (NGS) を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献:Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing:Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. Frontiers in Microbiology.September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムを RT-PCR で 5′ 末端側の Fragment 1 と 3′ 末端側の Fragment 2 に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせて NGS を用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表 1 のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

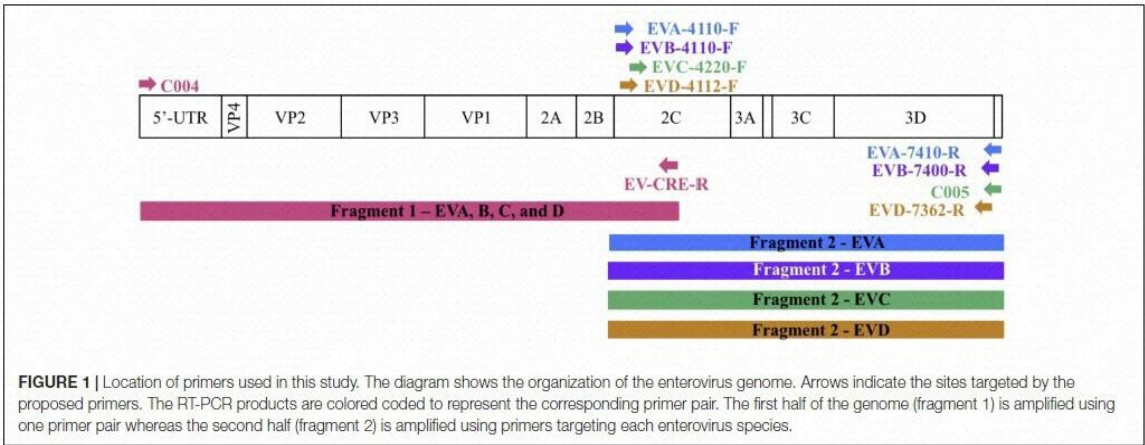


図1 参考文献 Figure 1 より抜粋

表1 参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55°C	一部 45°C

表2 使用試薬リスト(例示)

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μ M)	Thermo Fisher Scientific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scientific	18427013	100 μ l
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合があります。使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4°C 保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ(施設BのEV-A71のみ5株)を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3 増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B											
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4-1に示す^{注1)}。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4-2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくとも 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13 μlを作成する。

表4-1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μ l
dNTP mix (10mM each)	1 μ l
Template RNA	11 μ l
Total	13 μ l

表4-2

temperature	Reaction time
65°C	5 min

表5-1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5-1

Component	Volume
5 $\times$ SSIV Buffer	4 μ l
100 mM DTT	1 μ l
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200U/ μ L)	1 μ l
annealed RNA	13 μ l
Total	20 μ l

表5-2

temperature	Reaction time
23°C	10 min
55°C	10 min
80°C	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5-1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である^{注2)}。表6-1のとおり反応調製液を作成し、表6-2の条件で反応させる^{注3)}。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 μ l
10 μ M Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 μ l
Nucleotide Free Water	9.5 μ l
cDNA	2 μ l
Total	25 μ l

表6-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×30 cycle
72°C	4 min 30 sec	

5-2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種(EV-A、EV-B、EV-C、EV-D)により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55°C では増幅がみられなかったことから 45°C に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5-2-1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7-1のとおり反応調製液を作成し、表7-2の条件で反応させる。

表7-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVA-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVA-7410-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表7-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8-1のとおり反応調製液を作成し、表8-2の条件で反応させる。

表8-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表8-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9-1のとおり反応調製液を作成し、表9-2の条件で反応させる。

表9-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVD-4112-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVD-7362-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表9-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5' -3' Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAAGT	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130 ^{※3}
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390 ^{※3}
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130 ^{※4}
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378 ^{※4}
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAAGATWGAC	4112 - 4132 ^{※5}
EV-D	EVD-7362-R	CCA AKTRACCAAAAATTACC	7362 - 7342 ^{※5}

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476

CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474

EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437

CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394

EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP (Beckman Coulter) 等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物を Nucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル(国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター)に記載されている NGSライブラリ調製(QIAseq FX)の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio)、LunaScript RT SuperMix Kit (NEB)の使用は避けた方がよい。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1. 本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3. と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1. 使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

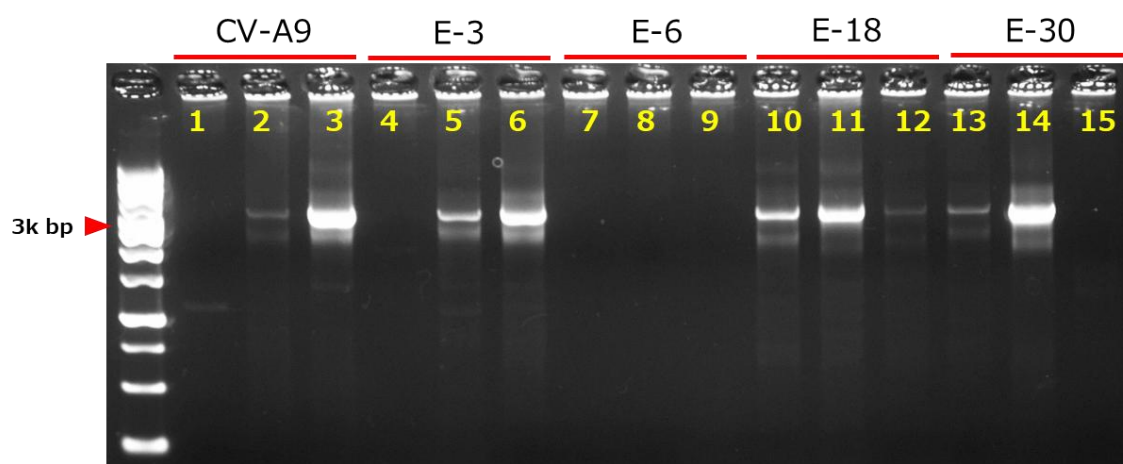
component	Volume
Nucleotide Free Water	3.0 μ l
2 $\times$ 1 step High Fidelity Buffer	12.5 μ l
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2.0 μ l
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
RNA	5 μ l
Total	25 μ l

表S1-2

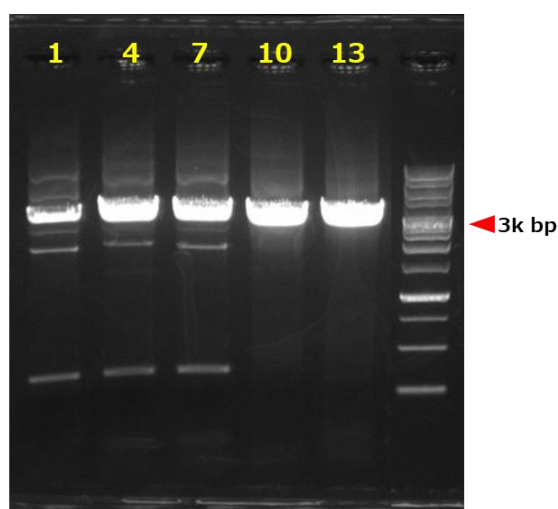
Temperature	Reaction time	
45°C	15 min	
94°C	2 min	
98°C	10 sec	
55°C	15 sec	$\times 40$ cycles
68°C	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は1施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1. 本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2. PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。

地衛研 ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル

QIAseq FX DNA Library kit 編

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

* 本マニュアルの内容に関する質問、問い合わせは、下記のゲノム解析ワーキンググループメーリングリスト宛にお願いします。

genome_working_group-ml-bounces ¥ chieiken.gr.jp

(¥を@に変更してください)

* 本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

- ・初版作成（2025 年 3 月 19 日）

ゲノム DNA ライブラリ作製手順の概要

Fragmentation

(ゲノム DNA の断片化処理)



Adapter ligation

(各サンプルへのインデックスとアダプターの付与)



Clean up and Elution

(ライゲーション後の溶液の精製)



Library amplification

(ライブラリの PCR 増幅)



Library size selection

本マニュアルでは、磁性ビーズによる方法とアガロースゲル電気泳動ゲル切り出しによる方法を併記した。



ライブラリの定量、モル濃度計算



ライブラリ変性、イルミナシーケンサーのラン

1. 試薬・装置

試薬等 消耗品

- DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)等 同等品
- QIAseq FX DNA Library Kit 各種 (QIAGEN : 180475 等)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher : Q32854 等)
- Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) 同等品
- Illumina 社 シーケンシングキット (300-cycle 以上可能なものを推奨)
- QIAGEN 社 Buffer EB
- 80%エタノール溶液 (用時調整)
- 低吸着性エッペンチューブ (1.5 ml)
- 100 mg/mL RNase A (ニッポンジーン) 同等品
- アガロース S (ニッポンジーン) 等 同等品
- ×10,000 GelRed (ニッポンジーン) 等 同等品
- 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) 等 同等品
- ×1 TAE buffer : 用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)
- QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) 等 同等品
- 3M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.0)
- イソプロパノール

器具・機器等

- Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher)
- Illumina 社シーケンサー
- PCR Thermal Cycler 各種 (ヒートリッドの温度制御可能なものが望ましい)
- AMPure XP 精製用磁石スタンド (Fast Gene Magna Stand 等)
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機 (スピンドウン用)
- 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- 電気泳動装置 : MupidR-exU (株式会社ミューピッド) あるいは同等品
- LED トランスイルミネーター : FAS-V (日本ジェネティクス) あるいは同等品
- その他基本的な実験器具類

2. ゲノム DNA 抽出

2-1. ゲノム DNA 抽出 (細菌)

菌種に応じた適切な培養条件で培養した菌体についてゲノム DNA を抽出する。一例として、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を使用した方法を紹介する。

1. 純培養した菌体を回収し 180 μ L の Buffer ATL でペレットを再懸濁する (グラム陽性菌の場合は前処理で菌体溶解のために追加のステップが必要となる。詳細はキットのマニュアルを参照)。
2. Proteinase K 20 μ l を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56°C でインキュベートする (1 時間～一晩)。
3. 4 μ L の RNase A (100 mg/ml) を添加しボルテックス操作で混和、室温 (15 ~ 25°C) で 2 分間インキュベートする。
4. 15 秒間ボルテックス混和する。200 μ l の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。200 μ L のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分に混和する。
5. 混合液 (形成した沈殿物を含む) を、キットに添付されている新しい 2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW1 を添加後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、500 μ L の Buffer AW2 を添加後、20,000 x g (14,000 rpm) で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
8. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50~100 μ L の Buffer EB を DNeasy メンブレン上に添加する。室温 (15~25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、ゲノム DNA を溶出する。

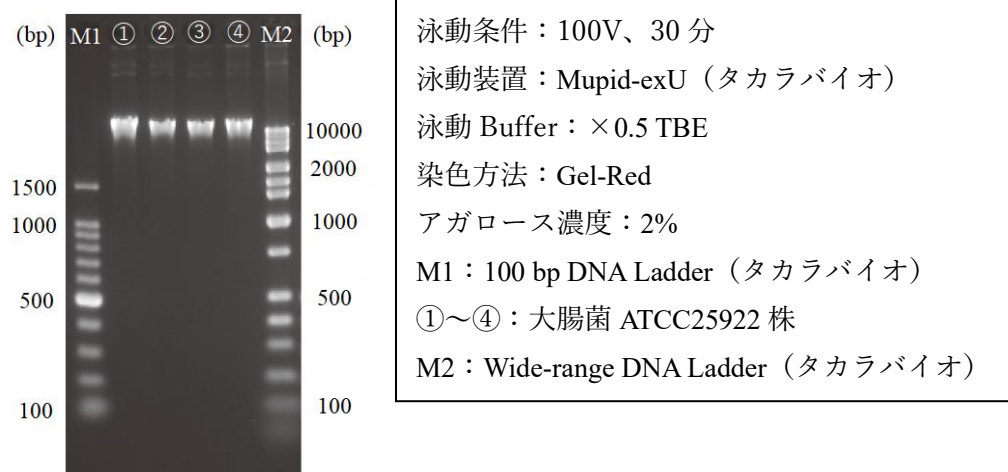
【ゲノム DNA の品質評価】

- ・アガロースゲル電気泳動で主に 10 kbp 以上の高分子DNA が観察されること（下図参照）

オプション

NanoDrop 等の分光光度計での吸光度測定が可能であれば、A260/A280 が 1.7 以上であることを確認するとよい。ただし、A260 から換算した DNA 濃度は後述の Qubit による測定結果とは一致しないことが多い。DNA 濃度調製は、Qubit 等の蛍光色素を用いて二本鎖 DNA 濃度を正確に定量可能な機器の測定結果を元にすること。ただし、本マニュアルは Qubit を使用した検討結果に基づいており、Qubit 以外の蛍光試薬を用いる場合は濃度設定について事前に検討することを推奨する。

（参考図 大腸菌 ATCC25922 株 DNA のアガロースゲル電気泳動例）



2-2. DNA 濃度測定

Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って濃度測定を行う。Qubit での測定範囲外（Out of range）となった場合は適宜希釈して再測定する。ゲノム DNA は、Buffer EB（QIAGEN）で 20 ng/μL に希釈し、ライブラリ作製に用いる。

【注釈】 メーカー使用説明書では、Qubit 試薬は 6 ヶ月間安定と記載されている。

操作例：

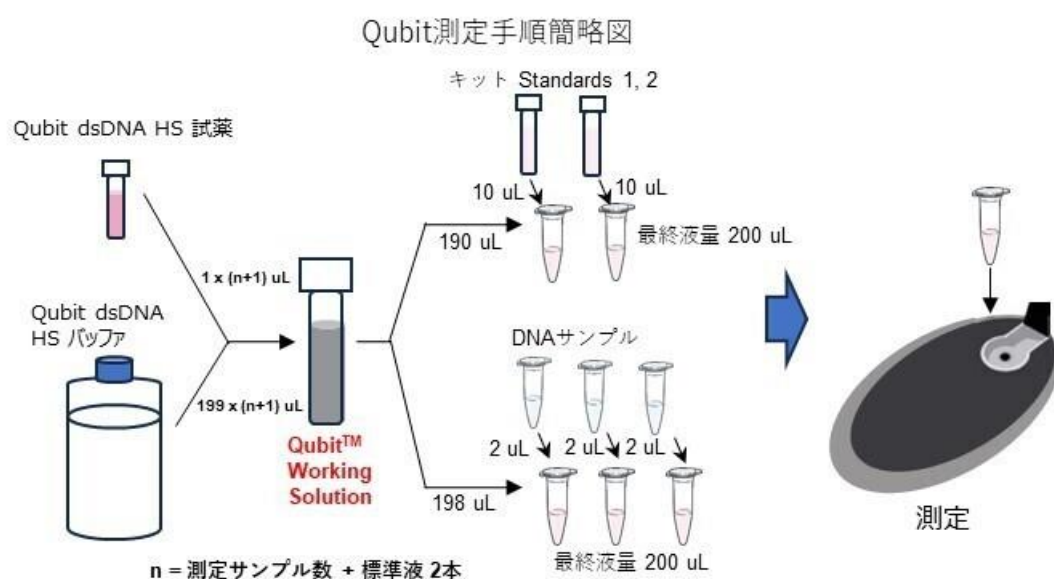
【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit （Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube （Thermo Fisher Scientific）

【手順】

- ・ 下図（Qubit 測定手順簡略図）を参考に、標準液（standard #1, standard #2）と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。検体数を n として、Qubit Reagent $n+2$ μL 、Quant-IT Bufer $199 \times (n+2)$ μL を混合する。
- ・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μL を分注する。
- ・ Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 μL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。
- ・ DNA サンプル 2 μL に Qubit working solution 198 μL を加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。



（サーモフィッシャー社 Qubit 2.0 Fluorometer カタログを参考に作図）

3. ライブラリ作製

QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)

*本マニュアルでは、キットのプロトコルの 1/2 スケールで実施する。

* Clean up and Elution を除く全ての作業を氷上のアルミブロック上で実施する。

※検体数が多い場合は全ての作業について、各マスターミックスや AMPure Beads を 8 連チューブに必要量分注しておき、8 連ピペットを用いて反応チューブに分注・ピペッティングするとサンプル間の時間差や試薬の入れ忘れ、コンタミネーションのリスクが軽減できる。

注意点

本製品は各アダプターが使いきりであり、アルミプレートシールで封をされた 96well プレートに入っている。本プロトコルは 1/2 スケールで実施する関係上、アダプター全量を使用しないため、一度解凍して 8 連チューブなど別の容器に移して再凍結保存 (-20℃以下) しておき、必要分だけ取り出して使用することを推奨する。ただし、飛沫によるアダプター同士の交差汚染を防ぐため 96well プレートの遠心操作は必須であり、また、アルミプレートを剥がす場合は交差汚染の防止に細心の注意を払うこと。

3-1. Fragmentation (ゲノム DNA の断片化処理)

- ・ サンプル分の 0.2 mL PCR チューブ もしくは 96 well PCR プレートを用意
- ・ 下記の Fragmentation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるように調製する。

試薬	容量 (1 検体あたり)
Nucleotide Free Water	15.0 μL
Fx Buffer, x10	2.5 μL
Fx Enzyme Mix	5.0 μL
Total	22.5 μL

※調製後のマスターミックスはボルテックス厳禁

- ・ マスターミックスを 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する。
- ・ 20 ng/μL に調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、8 連ピペットの目盛りを 10 μL に設定して 10 回以上ピペッティングする
- ・ スピンドウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

4°C	1 min
32°C	3 min
65°C	30 min
4°C	1 min

※ ヒートリッド温度が変更可能な機種であれば 80°C に設定する（注釈参照）

※ 試薬調整前にプログラムを開始し、4°C で pause しておくとい

- ・ 反応終了後、すぐに PCR チューブをスピンドウンし氷上のアルミブロック上に置く。

注釈

QIAGEN のマニュアルではヒートリッド温度は 70°C と記載されている。これはヒートリッドが高温の場合、32°C の Fragmentation の工程に影響が出るためであるが、本プロトコルでは SARS-CoV-2 のゲノム解析マニュアルの記載に倣い 80°C とした。リッド温度が変更できない機種の場合は、32°C 反応中、リッド(蓋)を開放して、65°C のステップになってからリッドを閉めることを推奨する。また、リッド温度を 70°C~105°C 設定で反応させた場合の断片化の経時変化を巻末に参考データとして記載している（Appendix 図 1、2）。

3-2. Adapter Ligation（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	7.5 μL
DNA Ligation Buffer, x5	10.0 μL
DNA Ligase	5.0 μL
Total	22.5 μL

- ・ 上記 Ligation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるよう調製し、新しい 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する
- ・ 対応するアダプターを 2.5 μL 加え、数回ピペッティング
- ・ Fragmentation 後の DNA を全量（25 μL）加え、ピペッティング（20 回以上）で十分混和する。

- ・ スピンドアウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

20°C	15 min
------	--------

※ヒートリッドは 20°C、もしくは開放する

※試薬調整前にプログラムを開始し、20°C で pause しておくとい

- ・ 反応中に Agencourt AMPure XP beads を冷蔵庫から室温に出しておく

注意点

DNA Ligation Buffer は非常に粘性が高い液体のため、以下の手順で十分に Mixture を混合することを推奨する。これらの混合が不十分の場合はライブラリの質が低下する。

- ・ Nucleotide Free Water と DNA Ligation Buffer, x5 を混合後、ボルテックスで十分混合した後、Ligase を加えてタッピングあるいはピペッティングで混合し Ligation マスターミックスとして使用する。

3-3. Clean up and Elution (磁性ビーズ精製 2 回による、未反応アダプター等の除去)

(用意するもの)

Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)

80%エタノール (用時調製)

0.2 mL チューブ用マグネットスタンド (日本ジェネティクス社など)

- ・ AMPure Beads を室温に戻しておく。

< 1 回目の精製 >

- ・ AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和し、底部に沈んでいる磁気ビーズを均一化させる。
- ・ AMPure Beads を 40 μL (0.8 倍量) ずつ加え、ピペッティングで混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間程度 (上清がクリアになるまで) 静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間程度静置し、ビーズを乾燥させる (乾燥させすぎ注意)。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。
- ・ チューブをマグネットスタンドから取り出し、25 μL の buffer EB を加える。
- ・ ピペッティング後、スピンドウンする。

※この過程のビーズは固まりやすく、分散しづらいのでよくピペッティングすること。

- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。

< 2 回目の精製 >

- ・ AMPure Beads をボルテックスで十分混和する。
- ・ AMPure Beads を 27.5 μL (1.1 倍量) ずつ、回収した上清に加え、混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間程度 (上清がクリアになるまで) 静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。
- ・ チューブをマグネットスタンドから取り出し、13 μL の buffer EB を加える。
- ・ ピペッティング後、スピンドウンする。
- ・ マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を 11.75 μL 回収する。

3-4. Library Amplification (ライブラリの PCR 増幅)

試薬	容量 (1 検体あたり)
Primer Mix (10 μ M each)	0.75 μ L
Hi-Fi PCR マスターミックス, x2	12.5 μ L
Total	13.25 μ L

- ・ 上記 PCR マスターミックスをサンプル数 + α 反応分調製し、転倒混和後スピンドウン。
- ・ 13.25 μ l を Clean up and Elution で溶出したサンプル(11.75 μ L)に添加しピペッティングで混和する。
- ・ スピンドウン後サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う。

98°C	2 min
6 cycles of	
98°C	20 sec
60°C	30 sec
72°C	30 sec
↓	
72°C	1 min

【注釈】 この工程を終えた検体について、-20°C保存可能である。

4. ライブラリサイズセレクション

ライブラリの精製およびサイズセレクションはその後の Run の結果に大きく影響する。本マニュアルではアガロースゲル電気泳動後のゲル切り出しによる精製方法と、キットの公式プロトコルに準じた磁性ビーズによる精製方法を記載する。

なお、本工程では既に Index による各サンプルの標識が完了しているので、複数サンプルをプールして実行しても良い。ただし、その際は各個別サンプルの濃度やクオリティについては検証不可となるので注意が必要である。

注釈

それぞれの精製方法によって得られたリードデータの質や、注意点などについては巻末の Appendix で解説しているのでどちらの手法を採用するかの参考にしていきたい。ただし、磁性ビーズを使用した精製方法では Bioanalyzer や MultiNA、TapeStation 等の、キャピラリー電気泳動装置のスミア解析機能によるライブラリサイズの把握が必要となるため、それらの装置を保有していない施設ではゲル切り出しによる精製方法を選択することを推奨する。

4-1. 電気泳動によるゲル切り出し (4-2 ビーズ精製を選択する場合は不要)

(用意するもの)

- ・ ゲル切り出し用トランスイルミネーター：BLoK LED Transilluminator (GeneDireX) 等 同等品 (DNA 損傷の観点から UV イルミネーターは非推奨)
- ・ アガロース S (ニッポンジーン) 等 同等品
- ・ ×10,000 GelRed (ニッポンジーン) 等 同等品
- ・ 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) 等 同等品
- ・ ×1 TAE buffer：用時調製
- ・ FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)
- ・ QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) 等 同等品
- ・ イソプロパノール

(ゲルの作成方法)

* 状況によっては泳動する溶液量が多いため、厚めのゲルを作製するとよい。ゲルが厚いと後染めでは染まりにくいので、染色方法は先染めを推奨する。

- ・ ×1 TAE buffer と 1%重量のアガロースを混合する。
- ・ 電子レンジで溶解する。
- ・ 50°Cの恒温水槽で保温する。
- ・ 1/10,000 量の×10,000 Gel Red を混合する。
- ・ コームを立てたゲルメーカーに流し、固まるまで待つ。
- ・ 冷蔵庫で十分冷却して、ゲルを完全に固化させる。
- ・ コームを外し、保湿して保存する。 ※用事調製する。

(PCR 産物の泳動)

- ・ PCR 反応後の各サンプル (25 μ L) に $\times 6$ Loading Buffer を 5 μ L 加える。
- ・ 各ウェルにアプライする。
- ・ 両サイドのマーカーレーンに 100bp DNA Ladder を 15 μ L アプライする。
- ・ 100 V、30 分間程度泳動する。
- ・ ブルーライトのイルミネーター上で泳動像を確認する。
- ・ 500-600bp のサイズを切り出し、2 mL マイクロチューブに回収する。

(FastGene アガロース ゲルバンドカッターを用いるとよい)

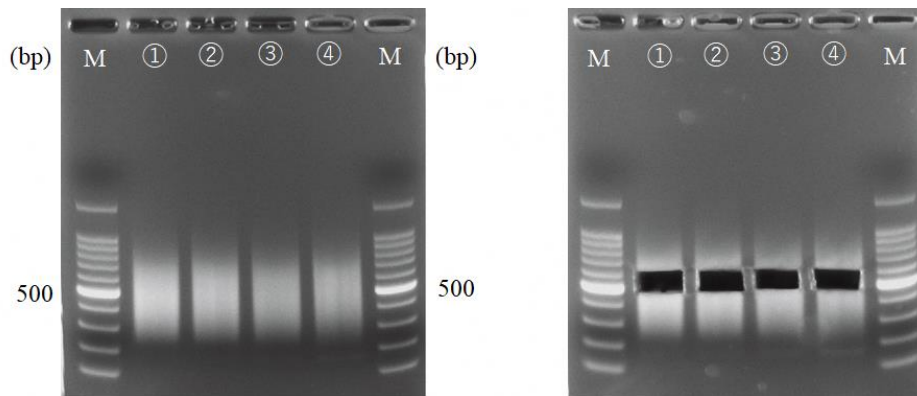
注釈

※複数サンプルをプールする場合は、例えば全量を 36 μ L となるようにし、 $\times 10$ Loading Buffer を 4 μ L 加えてから各ウェルにアプライすること。

(QIAquick Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出)

- ・ 切り出したゲルスライスの重量を測定する。
- ・ 測定した重量の mg を μ L と見立て、3 倍量の Buffer QG を加えてボルテックスする。
- ・ 50°C のヒートブロック上で時折ボルテックスしながら 10 分間溶解する。
- ・ 溶液の色がオレンジ色、あるいは紫色となった場合は 3M 酢酸ナトリウム水溶液を 10 μ L 加えてボルテックスする。
- ・ ゲル重量と同量のイソプロパノールを加えてボルテックスする。
- ・ QIAquick カラムに溶解したサンプルを入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ Buffer QG を 500 μ L 入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ Buffer PE を 750 μ L 入れて遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- ・ カラムに何も入れないまま遠心 (10,000 x g 以上、1 分) する。
- ・ ろ液を捨て、1.5mL のマイクロチューブを取り付ける。
- ・ メンブレンの中央に 30 μ L の Buffer EB を添加し、1 分間静置する。
- ・ 遠心してマイクロチューブ内に溶出された DNA を回収する。
- ・ 完成したライブラリーは、-30°C で 1 ケ月程度保存可能

(参考図 大腸菌 ATCC25922 株における切り出し前後のゲル画像例)



左：切り出し前 右：切り出し後

ライブラリ調製キット：QIAseq FX DNA Library UDI-A Kit

泳動条件：100V、30 分 泳動装置：Mupid-exU (タカラバイオ)

泳動 Buffer：×1 TAE アガロース濃度：1% #Gel-Red 先染め

切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator (GeneDireX)

ゲルカッター：FastGene アガロース ゲルバンドカッター (日本ジェネティクス)

M：100 bp DNA Ladder (タカラバイオ)

①～④：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

4-2. ビーズ精製 (4-1. 電気泳動によるゲル切り出しを選択した場合は不要)

Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) 等 同等品

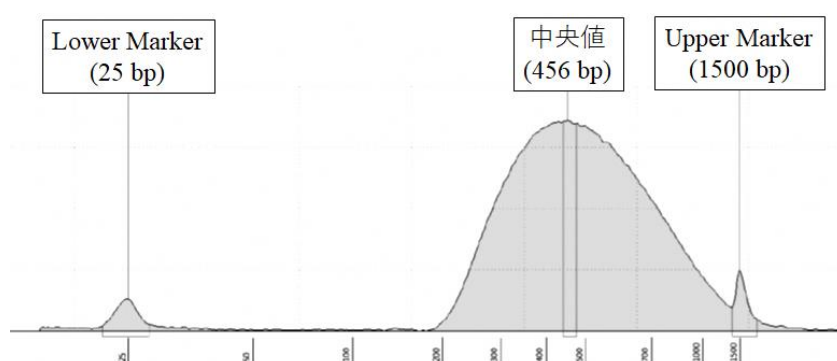
80%エタノール (用時調製)

0.2 ml チューブ用マグネットスタンド (日本ジェネティクス社など)

- ・ AMPure Beads を室温に戻しておく。
- ・ AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和する。
- ・ AMPure Beads を 30 μ L (1.1 倍量) ずつ加え、ピペッティングで混和する。
- ・ 室温で 5 分間静置する。
- ・ マグネットスタンドに設置し上清が清澄化するまで 2 分間程度静置する。
- ・ ビーズに触れないように上清を取り除く。
- ・ チューブをスタンドに設置したまま、200 μ L の 80%エタノールを加える。
- ・ 30 秒間静置後、上清を取り除く。
- ・ エタノール洗浄を再度繰り返す (計 2 回)。
- ・ 上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
- ・ チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

- ・チューブをマグネットスタンドから取り出し、30 μ L の buffer EB を加える。
- ・ピペッティング後、スピンドウンする。
- ・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。
- ・Bioanalyzer や MultiNA 等のキャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によりライブラリサイズの分布を確認し、中央値を控えておく。
- ・完成したライブラリーは、-30°Cで 1 ヶ月程度保存可能

(参考図 ビーズ精製後のスメア解析例)



使用機種：Agilent 2200 TapeStation (アジレント・テクノロジー)
 使用キット：High Sensitivity D1000
 分析サンプル：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

5. ライブラリ定量

5-1. Qubit によるライブラリ DNA 濃度測定

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

Qubit Assay Tube (Thermo Fisher Scientific)

【手順】

- ・ 本マニュアル 7 ページの Qubit 測定手順間略図を参考に、標準液 (standard #1, standard #2) と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。
- ・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μ L を加える。
- ・ Qubit DNA HS Standard #1, #2 10 μ L を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。
- ・ 精製後の DNA ライブラリ 2 μ L に Qubit working solution を 198 μ L 加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。
- ・ 後述「ライブラリのモル濃度計算式」を用いてライブラリモル濃度を算出する。
- ・ Buffer EB (QIAGEN) で 4 nM となるように希釈する。

ライブラリのモル濃度計算式

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/\mu L)} \times 1,000,000\}}{\{\text{ライブラリの平均サイズ (bp)} \times 660\}}$$

例 1 : 500-600bp の範囲でゲル切り出しを行った場合

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/\mu L)} \times 1,000,000\}}{\{550 \text{ (bp)} \times 660\}}$$

例 2 : ビーズ精製後、スメア解析の中央値が 400bp だった場合

$$\text{ライブラリモル濃度 (nM)} = \frac{\{\text{ライブラリ濃度 (ng/\mu L)} \times 1,000,000\}}{\{400 \text{ (bp)} \times 660\}}$$

注釈

算出されたライブラリモル濃度が 4nM に満たない場合は、2nM になるように Buffer EB で希釈し、「6. ライブラリ変性等 Run 関係 : MiSeq での Run 時の変性・希釈作業」において 2nM を初期値とした手順に移ることが可能である。ただし、その場合は、同時に Run する全ての検体を 2nM に希釈する必要がある。

5-2. qPCR 法による定量（通常は行わない）

注釈

Qubit での定量値で想定通りのデータが得られなかった場合、より精度の高い定量法である qPCR 法での定量を行い、原因を推定する。qPCR 法としては、イルミナシーケンサーで用いられている P5、P7 配列をターゲットとした市販のキットが複数販売されている。本マニュアルでは、Itokawa らの qPCR 法によるライブラリ定量法を掲載する（5-2 参照）。

<https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-6qpvrddpzgmk/v1>

UltraPure[®]; Salmon Sperm DNA Solution Thermo Fisher #15632011

PhiX Control v3 Illumina, Inc. #FC-110-3001

PrimeTime[®] Gene Expression マスターミックス Integrated DNA Technologies #1055770

- ・ Salmon sperm DNA を 5 ng/μL に調整する。

試薬	容量 (μL)
Nucleotide Free Water	9,889
1 M Tris-HCl, pH 8.0	100
0.5 M EDTA	10
UltraPure DNA Solution 10 mg/ml	5
Total	10 mL

- ・ 上記 Salmon sperm DNA (5 ng/μL) を使用し、PhiX コントロールの希釈系列を作成する。

50 pM	100 μL
5 pM	100 μL
0.5 pM	100 μL
0.05 pM	100 μL

- ・ Primer & Probe Mix (20x) を調製する。

Probe	5 nM
P5 primer	5 nM
P7 primer	5 nM

Double-quenched probe (IDT) :

/56-FAM/ACACTCTTT/ZEN/CCCTACACGACGCTCTTC/3IABkFQ/

P5 primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

P7 primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'

- ・ ライブラリを Buffer EB で 100 倍または 1,000 倍に希釈しておく。

・ qPCR

試薬	容量 (μL ; 1 検体あたり)
Prime Time PCR マスターミックス	10
20x primer & probe mix	1
Nucleotide Free Water	8
希釈ライブラリ or 希釈 PhiX コントロール	1
Total	20 μl

95°C	2 min
30 cycles of	
97°C	5 sec
62°C	10 sec
68°C	15 sec

- ・ 得られた結果からライブラリのモル濃度 (nM) を算出する。

6. ライブラリ変性等 Run 関係

MiSeq のカートリッジは V2 と V3 で推奨のアプライ濃度が異なる。iSeq 100 も含めた各カートリッジの推奨濃度は下記の通りである。

- MiSeq Reagent kit V2: 10 pM からはじめ、クラスター密度を 1000-1200 K/mm² になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- MiSeq Reagent kit V3: 12 pM から始めて、1200-1400 K/mm² になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- iSeq 100 il Reagent v2: 50 ~ 100 pM (変性作業無し) で occupancy が 80~90% を目指して最適化を行ってゆくのが良い。

MiSeq での Run 時の変性・希釈作業

- ・ 氷を用意しておき、HT1 バッファーとアルミブロックを冷やしておく。
- ・ 4 本の 1.5 ml チューブを用意、それぞれ以下の用途に使用する。

各ライブラリを 4 nM に希釈した場合 (推奨)

- チューブ[N]: 0.2 N NaOH 調製用 (Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合)
 - チューブ①: 1 次希釈用
 - チューブ②: 2 次希釈用 (HT1 バッファー 990 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
 - チューブ③: 3 次希釈用 (HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
-
- ・ チューブ①に ライブラリ溶液を 5 µL 入れておく。
 - ・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 5 µL を チューブ① に加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ スピンドアウンする。
 - ・ 室温で 5 分間インキュベーション (変性) 後すぐに 2 次希釈へ進める。
 - ・ 1 次希釈後のライブラリ溶液 (チューブ①) 全量 10 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
 - ・ Vortex でよく混ぜ (10 秒)、3 次希釈へ進める。
 - ・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。
- 上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/200 まで希釈される (4 nM→20 pM)。
チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する (最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL)。

各ライブラリを 2 nM に希釈した場合

- チューブ[N]: 0.2 N NaOH 調製用 (Nuclease-Free Water 800 μ L と 1N NaOH 200 μ L を混合)
 - チューブ①: 1 次希釈用
 - チューブ②: 2 次希釈用 (HT1 バッファー 980 μ L を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
 - チューブ③: 3 次希釈用 (HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく)
-
- ・ チューブ①に ライブラリ溶液を 10 μ L 入れておく。
 - ・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 10 μ L を チューブ① に加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ スピンダウンする。
 - ・ 室温で 5 分間インキュベーション (変性) 後すぐに 2 次希釈へ進める。
 - ・ 1 次希釈後のライブラリ溶液 (チューブ①) 全量 20 μ L を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
 - ・ Vortex でよく混ぜ (10 秒)、3 次希釈へ進める。
 - ・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
 - ・ Vortex でよく混ぜる (5 秒)。
 - ・ チューブ③から 630 μ L を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/100 まで希釈される (2 nM→20 pM)。チューブ③が計 1000 μ L となるように Run したい最終濃度に希釈する (最終を 15pM としたいのであれば、②:750 μ L + HT1: 250 μ L)。

注釈

サンプル濃度が高すぎるとオーバークラスターにより、リードデータが得られない場合がある。不慣れな施設は、まずは、やや低めの最終濃度で試すほうが安全である。
また、2 nM よりも低い濃度に希釈することは、2 次希釈液への NaOH の持ち込みが多くなる理由でメーカーから推奨されていない。

QIAseq FX DNA Library UDI キットを使用した際のサンプルシートの作成方法について

2025 年 3 月現在、QIAseq FX DNA Library には CDI アダプター付属の製品と Unique Dual Index (UDI) アダプター付属の製品が販売されている。このうち CDI アダプターはイルミナ純正の TruSeq キットと同一のインデックス配列であるため、イルミナ NGS に付属の Local Run Manager (LRM) の初期状態でインデックスの指定が可能である。一方で、UDI アダプターキットのインデックス配列は QIAGEN 独自の配列であるため、LRM には配列が登録されておらずサンプルシートの作成が困難である。そこで、LRM に UDI アダプターキットのインデックス配列を登録するための手法を掲載する。

- ・ 別添の 4 種類のテキストファイルを USB メモリ等の外付けドライブに保存し、イルミナ NGS (iSeq または MiSeq) に接続する。
- ・ LRM を立ち上げ、TOOLS→Library Prep kit を選択する
- ・ Add Library Prep Kit を押し、目的のテキストファイルを選択する（使用するキットによって必要に応じて A~D まで 4 回繰り返す）*通常 A キットしか使用しないという施設は A のみ登録すると間違いがなくて良い。
- ・ サンプルシート作成画面に行き、QIAseq の UDI キットが選択できるようになっていれば成功(ウェルポジション指定で自動的に R1 と R2 のインデックス配列が入力される)

ゲノム解析ワーキンググループメンバ

池田徹也	北海道立衛生研究所
瀬戸順次	山形県衛生研究所
大澤修一	茨城県衛生研究所
塚越博之	群馬県衛生環境研究所
江原勇登	埼玉県衛生研究所
久保田寛顕	東京都健康安全研究センター
中嶋直樹	神奈川県衛生研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所
鈴木雅和	愛知県衛生研究所
高橋剣一	名古屋市衛生研究所
若林友騎	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
野本竜平	神戸市健康科学研究所
平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
亀山光博	山口県環境保健センター
平井真太郎	愛媛県立衛生環境研究所
重村洋明	福岡県保健環境研究所
グループ長：地全協 精度管理部会員 神戸市健康科学研究所 岩本 朋忠	

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

厚生労働行政推進調査事業費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者 貞升 健志）

Appendix

1. Fragmentation における Lid 温度および反応時間の影響について

本マニュアル 3. ライブラリ作製の Fragmentation については、公式マニュアルでは input DNA 量の違いにより 2～30 分という記載になっている。本マニュアルでは input DNA 量を 50 ng に固定しているため、反応時間が断片化に与える影響は大きい。そのため、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、反応時間による断片化の進行具合を検証した。なお、検討は以下の試薬および機器を使用し、本マニュアルの作業手順に従って実施した。

DNA 抽出試薬：DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

キャピラリー電気泳動：Agilent 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー)

Agilent High Sensitivity DNA キット(アジレント・テクノロジー)

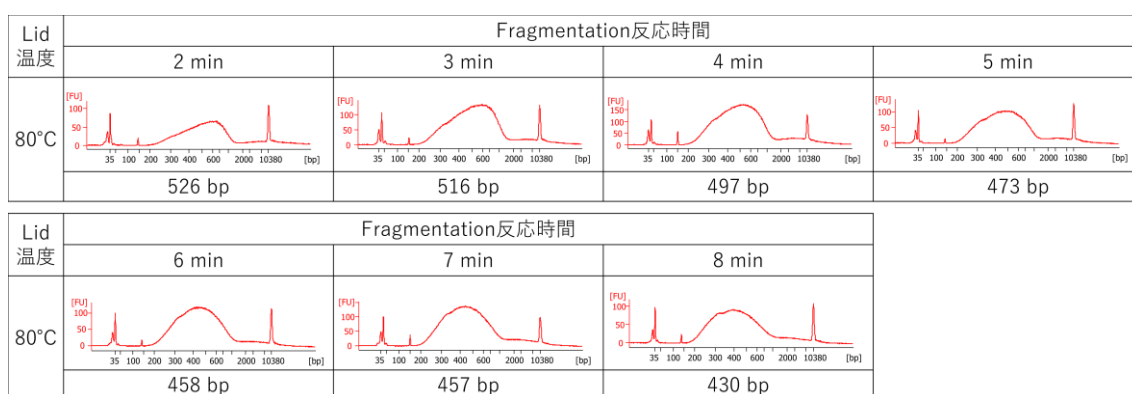


図 1. Fragmentation の反応時間における断片化の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

断片化は反応時間 3 分でも十分進行しており、ライブラリ作製に適していると考えられた。MiSeq を使用してリードデータを取得する場合、片側 250 または 300 bp となるペアエンドリードを想定するケースが多いため、少し長めの断片を残存させる条件で反応時間を設定することを推奨する。

続いて、Lid 温度が断片化に与える影響について検証した。同様に大腸菌 ATCC25922 株を用いて Lid 温度を 70℃、80℃、105℃に設定し反応を行った。105℃については Fragmentation 反応中に Lid を開放した状態と閉めた状態の 2 条件で検証を行った。その結果を図 2 に示す。70℃、80℃、105℃（開放）では断片化の進行に大きな違いは見られなかったが、105℃で閉めた場合は若干断片化の進行が早くなる傾向が認められた。しかし、その影響は軽微であり、Lid を開放した条件では他と差がないため、Lid 温度を調節可能なサーマルサイクラーを所持しない施設は参考にしていただきたい。

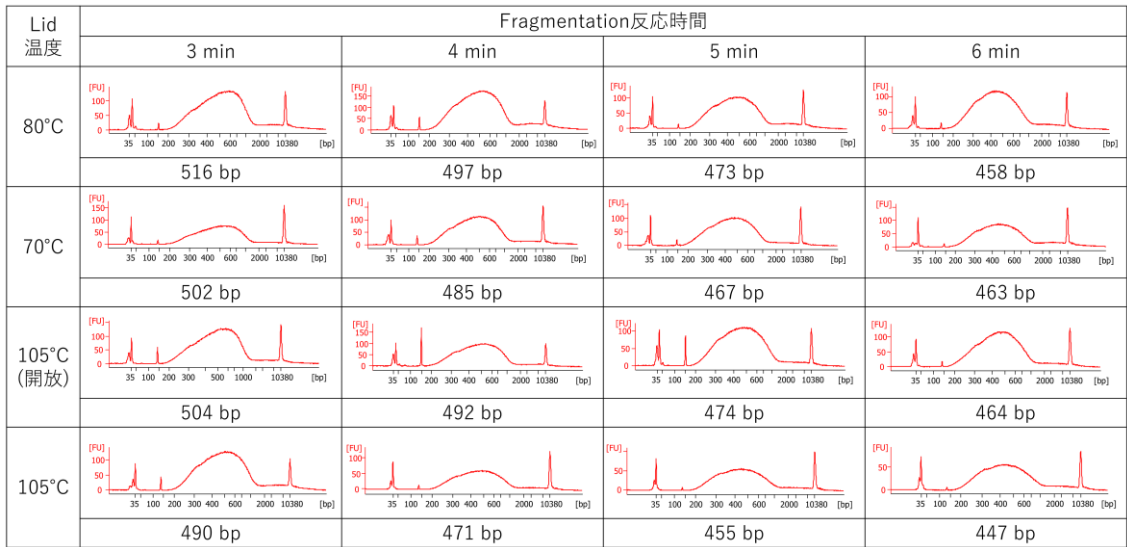


図 2. Lid 温度の違いによる Fragmentation 反応の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

2. ライブラリ精製方法の違いによるリードデータへの影響について

本マニュアル4. ライブラリのサイズセレクションの項でも述べたように、ライブラリの精製やサイズセレクションはその後の解析に影響を与える重要な工程である。キットの公式マニュアルでは磁性ビーズによる精製手法が記載されている。この手法は簡便であるが、ライブラリサイズの推定が難しい点や、ライブラリサイズがブロードに広がってしまうという難点がある。このことは、想定を大幅に逸脱したサイズのフラグメントが混ざること、クラスターの形成不全や、解析サイクルの後半部分でのリードのクオリティ低下を招くことにつながってしまう。一方で、電気泳動によるゲル抽出での精製方法は、工程としては煩雑になるものの、目的のサイズのライブラリのみを収集できるため、ライブラリサイズの推定が容易で質の良いリードデータを再現性良く取得することが可能となる。

本マニュアル作成に際し、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、ビーズ精製とゲル抽出の違いによるライブラリの状態と取得したリードデータの違いについて検証したので参考にしていただきたい。

両手法によるライブラリサイズの分布の解析結果を図3に示す。ゲル抽出精製が550bp付近で比較的シャープな山を形成しているのに対し、ビーズ精製ではアダプターダイマーやプライマーダイマーなどは見られなかったものの、山がブロードで1000 bpを超えるサイズのフラグメントも残存しているのがわかる。

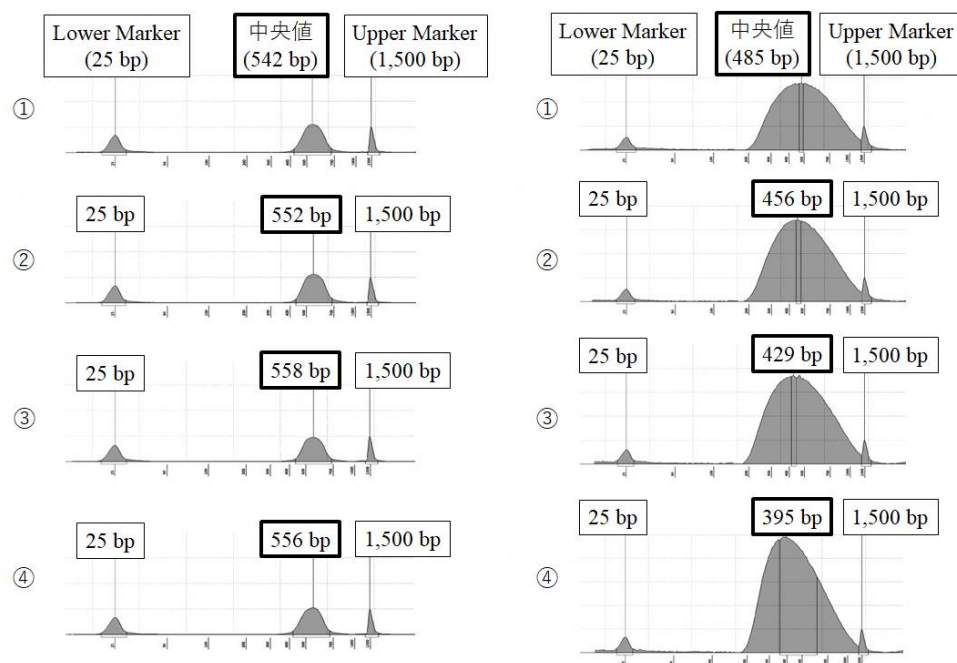


図3. ライブラリサイズの分布。ゲル抽出（左）とビーズ精製（右）を TapeStation により解析した

1000 bp を超えるフラグメントは MiSeq のクラスター形成過程において Bridge PCR がうまくいかずクラスター形成不全を引き起こす。そのため、想定したライブラリの DNA 濃度

から推定したライブラリの想定クラスター密度と実際の密度の乖離が大きくなってしまう可能性がある。

続いて、作製したライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてリードデータを取得し、fastp v0.23 によるトリミングを実施した。その結果、リード数の残存率はトリミングの前後でどちらの手法も 98%となり大きな違いはなかったが、残存した総リード長はゲル抽出が約 94%であるのに対し、ビーズ精製は約 74%しか残存せず、大きく差がついた (Table 1)。これはビーズ精製ではリードの後半部分のクオリティが急激に落ちることが原因と考えられる。

Table 1. トリミング前後でのリード数と総リード長の残存率

	残存リード数割合 (%)	残存総リード長割合 (%)
ビーズ精製	98.4	73.5
ゲル抽出精製	98.1	93.7

図 4 に示す通り、170 サイクル付近からビーズ精製のリードはクオリティの低下が確認される。これは insert size が短いリードでは反応サイクルの後半でアダプター領域以降を解析してしまうためであり、ライブラリ精製過程で短いフラグメントが残存してしまうことに起因する。

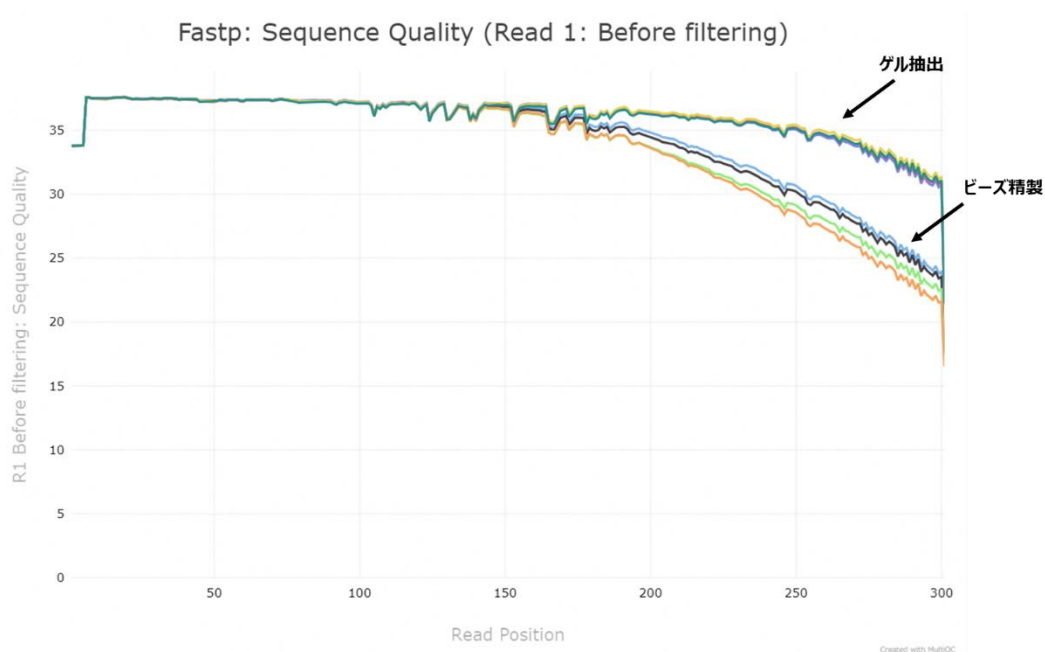


図 4. トリミング前のリードクオリティの推移。X 軸の数字は反応サイクル数と同義

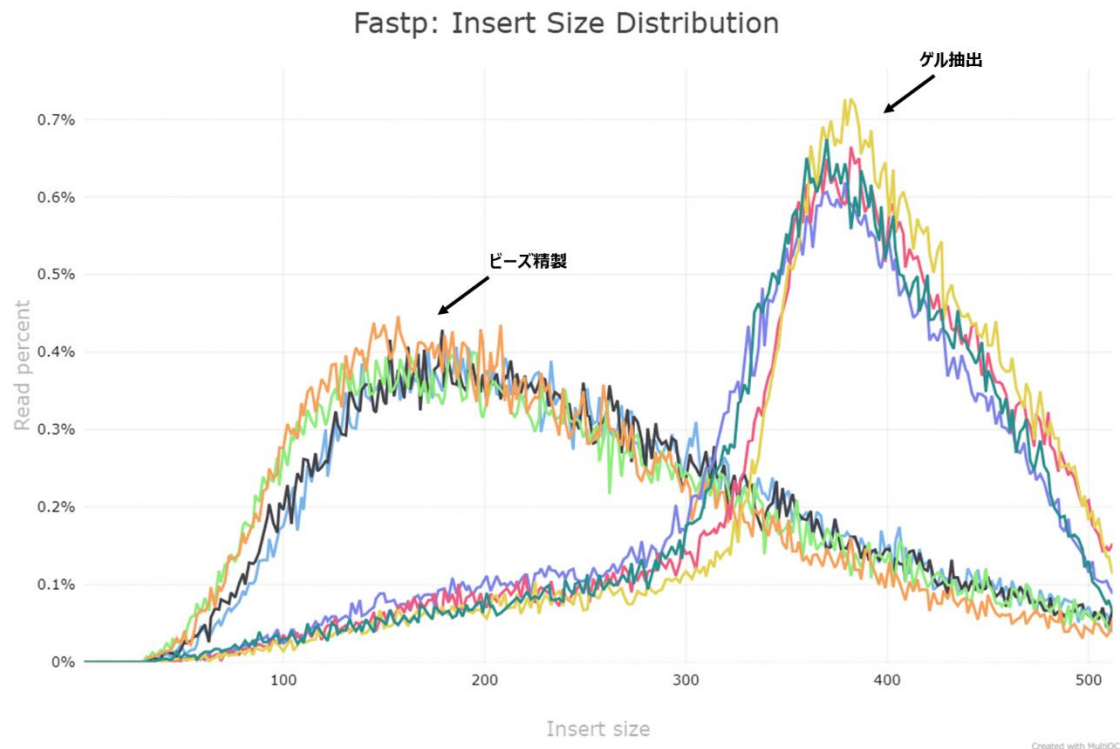


図 5. リードの Insert size の分布

またそれぞれのリードデータの Insert size の分布を図 5 に示した。ゲル抽出のピークは 380 bp 付近であるのに対し、ビーズ精製では 160 bp 付近がピークとなった。500 サイクルや 600 サイクルの Reagent kit で解析する際は短い Insert size では無駄になる部分が多いため得られたデータ量に対し、解析に使用できるデータ量の割合が少ないという問題が生じてしまう。

一方で、今回のリードデータを用いて大腸菌 ATCC25922 株の完全長配列 (Accession no. CP009072) をレファレンスとして SNVs 解析を実施したところ、取得した 8 検体間では SNV は検出されず、レファレンス配列に対しては 8 検体とも 2 SNVs が検出された。これは株の継代の際に蓄積された SNV であると考えられる。また、Assembly 結果もビーズ精製の方が若干コンティグ数が増える傾向があるが、概ねデータの差異は認められなかった。従って、ビーズ精製とゲル抽出ではインサートサイズなどの違いはあるが、SNVs 解析などでは同様の結果が得られるであろう。ビーズ精製の方がデータのロスが大きくなるため、目標とする解析に合わせて精製方法を選択するよう参考にしていただきたい。

地衛研 エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

*本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変した PCR と次世代シーケンサー (NGS) を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献: Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. *Frontiers in Microbiology*. September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムを RT-PCR で 5′ 末端側の Fragment 1 と 3′ 末端側の Fragment 2 に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせて NGS を用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表 1 のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

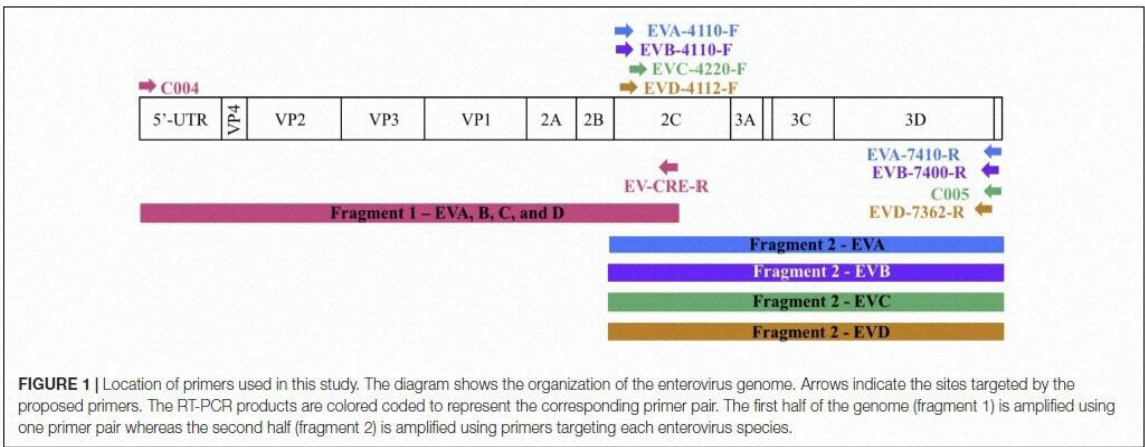


図1 参考文献 Figure 1 より抜粋

表1 参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55°C	一部 45°C

表2 使用試薬リスト(例示)

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μ M)	Thermo Fisher Scientific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scientific	18427013	100 μ l
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合があります。使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4°C 保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ(施設BのEV-A71のみ5株)を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3 増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B											
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4-1に示す^{注1)}。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4-2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくとも 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13 μlを作成する。

表4-1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μ l
dNTP mix (10mM each)	1 μ l
Template RNA	11 μ l
Total	13 μ l

表4-2

temperature	Reaction time
65°C	5 min

表5-1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5-1

Component	Volume
5 $\times$ SSIV Buffer	4 μ l
100 mM DTT	1 μ l
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200U/ μ L)	1 μ l
annealed RNA	13 μ l
Total	20 μ l

表5-2

temperature	Reaction time
23°C	10 min
55°C	10 min
80°C	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5-1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である^{注2)}。表6-1のとおり反応調製液を作成し、表6-2の条件で反応させる^{注3)}。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 μ l
10 μ M Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 μ l
Nucleotide Free Water	9.5 μ l
cDNA	2 μ l
Total	25 μ l

表6-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×30 cycle
72°C	4 min 30 sec	

5-2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種(EV-A、EV-B、EV-C、EV-D)により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55°C では増幅がみられなかったことから 45°C に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5-2-1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7-1のとおり反応調製液を作成し、表7-2の条件で反応させる。

表7-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVA-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVA-7410-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表7-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8-1のとおり反応調製液を作成し、表8-2の条件で反応させる。

表8-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表8-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9-1のとおり反応調製液を作成し、表9-2の条件で反応させる。

表9-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVD-4112-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVD-7362-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表9-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5' -3' Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAAGT	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130 ^{※3}
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390 ^{※3}
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130 ^{※4}
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378 ^{※4}
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAAGATWGAC	4112 - 4132 ^{※5}
EV-D	EVD-7362-R	CCA AKTRACCAAAAATTACC	7362 - 7342 ^{※5}

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476

CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474

EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437

CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394

EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP (Beckman Coulter) 等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物を Nucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル(国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター)に記載されている NGSライブラリ調製(QIAseq FX)の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio)、LunaScript RT SuperMix Kit (NEB)の使用は避けた方がよい。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1. 本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3. と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1. 使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

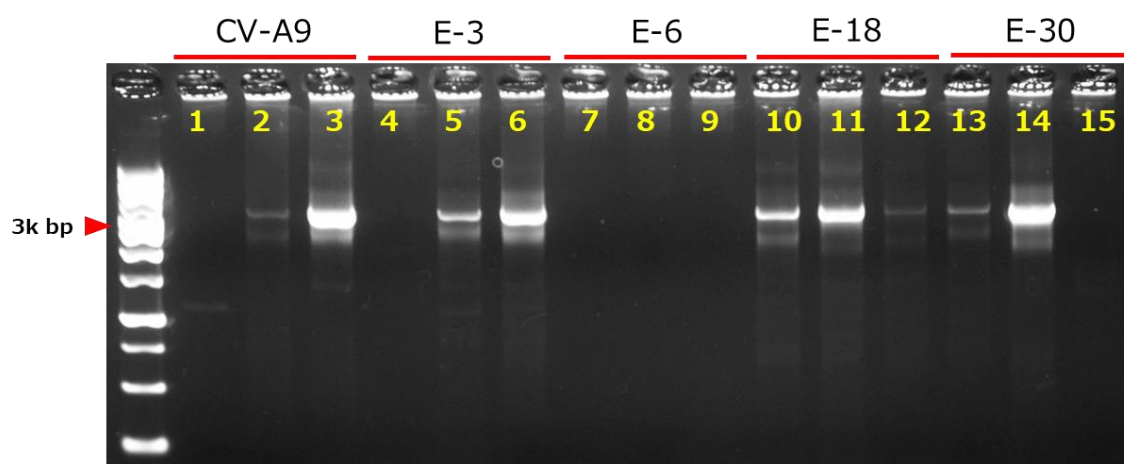
component	Volume
Nucleotide Free Water	3.0 μ l
2 $\times$ 1 step High Fidelity Buffer	12.5 μ l
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2.0 μ l
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
RNA	5 μ l
Total	25 μ l

表S1-2

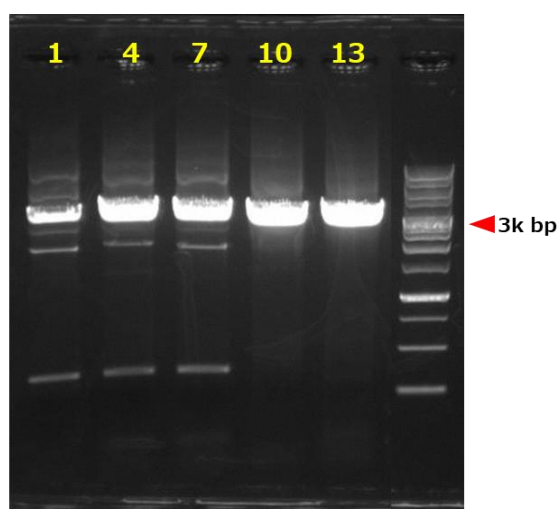
Temperature	Reaction time	
45°C	15 min	
94°C	2 min	
98°C	10 sec	
55°C	15 sec	$\times 40$ cycles
68°C	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は1施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1. 本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2. PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。