

測定標準作業書

Standard Operating Procedure

全ゲノムシーケンス

版数： 第 01 版

(作成・改訂) 2023 年 3 月 16 日

目 次

目 次	2
1 章 検査室の環境条件(検査室の温度及び湿度条件)	3
2 章 検査材料	3
2.1 材料名および検体量	3
2.2 採取条件	3
2.3 検体採取容器・提出容器	3
2.4 温度条件	3
2.5 検査不可材料・不可条件	3
2.6 干渉物質および交差反応	3
3 章 試薬・機器	3
3.1 推奨試薬	3
3.2 推奨機器	4
4 章 管理試料の取扱方法	5
4.1 管理試料	5
4.1.1 管理試料名	5
4.1.2 調製方法	5
5 章 検査手順	5
5.1 検体濃度・品質確認工程	5
5.1.1 DNA 吸光度測定	5
5.1.2 DNA 濃度測定	5
5.1.3 品質評価	5
5.2 測定工程	6
5.2.1 ライブラリー作製	6
5.2.2 ライブラリー定量	10
5.2.3 シーケンス	12
5.2.4 ユニークリード由来の塩基数の算出	14
6 章 測定上の注意事項	14
7 章 再検基準及び再検手順	14
8 章 精度管理手順	15
8.1 内部精度管理	15
8.1.1 ライブラリー作製精度管理	15
8.1.2 シーケンス作製精度管理	15
8.2 外部精度管理	15
8.2.1 精度管理手法	15

1 章 検査室の環境条件(検査室の温度及び湿度条件)

使用機器のマニュアルに書かれた推奨条件を遵守する。

2 章 検査材料

2.1 材料名および検体量

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (350bp)

材料名	検体量 (ライブラリーインプット量)
DNA	1 µg

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (550bp)

材料名	検体量 (ライブラリーインプット量)
DNA	2 µg

2.2 採取条件

96-well プレートまたはチューブに分注された DNA は提出時まで凍結保存する。

2.3 検体採取容器・提出容器

材料名	採取容器	提出容器
DNA	96-well プレート チューブ	96-well プレート チューブ

2.4 温度条件

材料名	提出温度	保管温度
DNA	凍結 (-10 °C以下)	凍結 (-25~-10 °C)

2.5 検査不可材料・不可条件

該当なし。

2.6 干渉物質および交差反応

該当なし。

3 章 試薬・機器

3.1 推奨試薬

3.1.1 購入試薬

No	試薬名	規 格	試薬製造社名
1	TruSeq DNA PCR Free HT Library Prep Kit	—	イルミナ株式会社
2	IDT for Illumina-TruSeq DNA UD Indexes	—	イルミナ株式会社

3	NovaSeq_S4_Reagent_v1.5_300 cycles	—	イルミナ株式会社
4	NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	—	イルミナ株式会社
5	Distilled Water, Deionized, Sterile (DW)	500 mL	株式会社ニッポンジーン
6	エタノール (99.5)(EtOH)	500 mL	富士フイルム和光純薬株式会社
7	KAPA Library Quantification Kits	—	日本ジェネティクス
8	1M Tris-HCl (pH8.0)	500 mL	富士フイルム和光純薬株式会社
9	1M Tris-HCl (pH8.5)	500 mL	富士フイルム和光純薬株式会社
10	NaOH	500 mL	シグマアルドリッチジャパン合同会社
11	High Sensitivity D5000 試薬キット	—	アジレント・テクノロジー株式会社
12	High Sensitivity D5000 ScreenTape	—	アジレント・テクノロジー株式会社
13	Genomic DNA Reagents	—	アジレント・テクノロジー株式会社 アジレント・テクノロジー
14	Genomic DNA ScreenTape	—	アジレント・テクノロジー株式会社
15	Qubit™ dsDNA BR Assay	100 テスト	サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社

3.2 推奨機器

3.2.1 機器名

№	機器名	型式	製造社名
1	次世代シーケンサー	NovaSeq 6000	イルミナ株式会社
2	DNA 断片化装置	—	Covaris
3	サーマルサイクラー	VeritiPro™ サーマルサイクラー	サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社
4	卓上遠心機	PS-020	TOMY
5	分光光度計	NanoDrop One	サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社
6	蛍光光度計	QubitTM4 Fluorometer	サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社
7	Real-Time PCR 装置	QuantStudio™ 5 リアルタイム PCR システム	サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社
8	Agilent4200 TapeStation	G2991BA	アジレント・テクノロジー株式会社

4 章 管理試料の取扱方法

4.1 管理試料

4.1.1 管理試料名

購入 DNA※もしくは検査済み検体

※例：米国国立標準技術研究所（NIST）提供

DNA（Human DNA for Whole-Genome Variant Assessment 等）

4.1.2 調製方法

濃度・品質確認を行い高品質で検査に十分な濃度であること確認し
適切な濃度に調整及び分注して凍結保存する

5 章 検査手順

5.1 検体濃度・品質確認工程

工程	作業内容	備考
DNA 吸光度測定 (NanoDrop)	5.1.1 DNA 吸光度測定 2 本鎖 DNA の測定設定にした NanoDrop のステージに 1 μL の DNA サンプルの溶媒を Blank として測定する - ステージを新しいキムワイプで清掃し、1 μL の DNA サンプルを乗せて測定する - 測定完了後、新しいキムワイプで掃除する	
DNA 濃度測定 (Qubit)	5.1.2 DNA 濃度測定 2 種類の Standard とサンプル数分の Qubit チューブを準備する - Qubit Working Solution を 1 チューブあたり、 Qubit™ dsDNA BR Buffer: Qubit™ dsDNA BR Reagent=199 μL: 1 μL で調製し、Standard 用に 190 μL を 2 本、サンプル用に 198 μL をサンプル数分の Qubit チューブに分注する 2 種類の Standard(#1,#2)を 190 μL の試薬が入った Qubit チューブへ以下の割合で分注する Qubit Working Solution: Standard= 190 μL: 10 μL - サンプルを 198 μL の試薬が入った Qubit チューブへ以下の割合で分注する Qubit Working Solution: サンプル= 198 μL: 2 μL - ボルテックス、スピンドウン後、2 分間静置する 2 本鎖 DNA の測定設定にした Qubit で 2 種類の Standard(#1,#2)を測定後、サンプルを測定する	
品質評価 (TapeStation)	5.1.3 品質評価 - Sample Buffer を十分にボルテックスし、スピンドウンする - Sample Buffer を 10 μL ずつ専用プレートの測定サンプル数分のウェルに分注する。 - Genomic DNA Ladder を軽くボルテックスし、スピンドウンする	

	4) 専用 8 連チューブの 1 番目のウェルに Sample Buffer と Ladder を下記の通り分注する 16 サンプルまで: Sample Buffer (10 μL) + Ladder (1 μL) 16 サンプル以上: Sample Buffer (20 μL) + Ladder (2 μL) 5) 専用プレートの各ウェルに DNA サンプルを 1 μL ずつ加える 6) プレートにふたをして、MS 3 ベーシックのボルテックスミキサーでボルテックス(2000rpm,60 秒間)を行い、スピンドウンする 7) 装置にプレート、Genomic DNA Screen Tape、Ladder、チップをセットする 8) サンプルを分注しているウェルをソフト上のプレートのウェルと一致するよう選択する 9) サンプル名を入力する 10) Start→Proceed で測定する	
--	--	--

5.2 測定工程

工程	作業内容	備考
ライブラリー作製	5.2.1 ライブラリー作製 1) DNA 断片化 ① Covaris 装置を起動し、メーカーのガイドラインに従ってセットアップする ② gDNA サンプルを最終液量が 55 μL 且つ、RSB を加えて以下の濃度になるように濃度調整を行う ・インサートサイズが 350 bp の場合は 20 ng/μL ・インサートサイズが 550 bp の場合は 40 ng/μL ③ 以下の通り、しっかり混ぜ合わせる。 ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌 ・[LS] 上下にピペッティング ④ 以下の通り、遠心する ・[HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する ・[LS] スピンドウンする ⑤ gDNA サンプル 52.5 μL を Covaris チューブに移す ⑥ 280 $\times$ g で 5 秒間遠心する ⑦ Covaris に Covaris チューブをセットし、目的の断片化に最適な設定で DNA の断片化を行う ⑧ 280 $\times$ g で 5 秒間遠心する ⑨ 各 Covaris チューブから CSP プレートの対応するウェルに上清 50 μL を移す 2) 断片化した DNA の精製 ① 十分に分散されるまで SPB をボルテックスする ② 各ウェルに SPB 80 μL を添加し、その後十分に混ぜ合わせる ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する ・[LS] 上下にピペッティングする ③ 室温で 5 分間インキュベートする ④ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する ⑤ 磁気スタンドに静置し、溶液が透明になるまで放置する (～8 分) ⑥ 各ウェル上清をすべて取り除く ⑦ 以下のとおり洗浄を 2 回行う	

- a. 各ウェルに新しく調製した 80%エタノール (EtOH) 200 μ L を添加する
- b. 磁気スタンドの上で 30 秒間インキュベートする
- c. 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄する
- ⑧ 20 μ L のピペットを使用して、各ウェルから残っている EtOH を取り除く
- ⑨ 磁気スタンド上で 5 分間風乾する
- ⑩ 各ウェルに RSB を 52.5 μ L を添加する
- ⑪ 磁気スタンドから取り外し、その後しっかり混ぜ合わせる
 - ・ [HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する
 - ・ [LS] 上下にピペッティングする
- ⑫ 室温で 2 分間インキュベートする
- ⑬ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する
- ⑭ 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する (2~5 分間)
- ⑮ 上澄み液 50 μ L を、IMP プレーットの対応するウェルに移す

3) 末端修復

- ① 各ウェルに CTE を 10 μ L を添加する
- ② ERP2 または ERP3 を 600 $\times$ g で 5 秒間遠心する
- ③ 各ウェルに ERP2 または ERP3 を 40 μ L 添加し、その後以下のとおり十分に混ぜ合わせる
 - ・ [HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌
 - ・ [LS] 上下にピペッティング
- ④ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する
- ⑤ 以下のとおりインキュベートする(各ウェルには 100 μ L 入っている)
 - ・ [HS] 予熱し蓋を閉じた 30 $^{\circ}$ C のマイクロヒーティングシステムに 30 分間置いた後、氷上に置く
 - ・ [LS] サーマルサイクラーにセットし、ERP プログラムを実施する。

プログラム名	温度 (Lid: 100 $^{\circ}$ C)	時間
[ERP] (100 μ L)	30 $^{\circ}$ C	30 min
	4 $^{\circ}$ C	∞

CTE は RSB に
代替可能

4) 大きい DNA 断片の除去

- ① 十分に分散されるまで SPB をボルテックスする
- ② 以下の計算式を用いて、SPB を末端修復サンプル 100 μ L あたり DW で 160 μ L に希釈する(15%の過剰量を含む)

	計算式	12 サンプルあたりの量の例
SPB	サンプル数 $\times$ 109.25 μ L	1311 μ L
DW	サンプル数 $\times$ 74.75 μ L	897 μ L

350 bp インサートサイズ用の希釈されたビーズミックス

	計算式	12 サンプルあたりの量の例
SPB	サンプル数 $\times$ 92 μ L	1104 μ L
DW	サンプル数 $\times$ 92 μ L	1104 μ L

	550 bp インサートサイズ用の希釈されたビーズミックス ③ 十分に分散されるまで希釈された SPB をボルテックスする ④ 希釈された SPB 160 μL を、各ウェルに添加し、その後以下のとおりしっかりと混ぜ合わせる ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌 ・[LS] 上下にピペッティング ⑤ 室温で 5 分間インキュベートする ⑥ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する ⑦ 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する（～5 分） ⑧ 上清 250 μL を CEP プレーットの対応するウェルに移す ⑨ 残留している希釈 SPB を廃棄する 5) 小さい DNA 断片の除去 ① 希釈していない SPB を、十分に分散されるまでボルテックスする ② 希釈していない SPB 30 μL 各ウェルに添加し、その後以下のとおり十分に混ぜ合わせる ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌 ・[LS] 上下にピペッティング ③ 室温で 5 分間インキュベートする ④ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する ⑤ 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する（～5 分） ⑥ 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄する ⑦ 以下のとおり洗浄を 2 回行う - 各ウェルに新しく調製した 80%エタノール (EtOH) 200 μL を添加する - 磁気スタンドの上で 30 秒間インキュベートする - 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄する ⑧ 20 μL のピペットを使用して、各ウェルから残っている EtOH を取り除く ⑨ 磁気スタンド上で 5 分間風乾する ⑩ 各ウェルに RSB 17.5 μL を添加する ⑪ 磁気スタンドから取り外し、その後以下のとおり十分に混ぜ合わせる ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する ・[LS] 上下にピペッティングする ⑫ 室温で 2 分間インキュベートする ⑬ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する ⑭ 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する（～5 分） ⑮ 上澄み液 15 μL を、ALP プレーットの対応するウェルに移す 6) 3'末端のアデニル化 ① 各ウェルに CTA を 2.5 μL を添加する ② ATL または ATL2 を 600 $\times$ g で 5 秒間遠心する ③ 各ウェルに 12.5 μL の ATL または ATL2 を添加し、以下のとおり十分に混ぜ合わせる ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する	作業を停止する場合、⑮でプレートを密封し、-25 $^{\circ}$C ～-15 $^{\circ}$C で最長 7 日間保管可能 CTA は RSB に代替可能
--	--	--

- ・[LS] 上下にピペッティングする
- ④ 以下のとおりインキュベートする(各ウェルには 30 μ L 入っている)
 - ・[HS]
 - a. 37 $^{\circ}$ C のマイクロヒーティングシステムに蓋を閉じて 30 分間置く
 - b. 70 $^{\circ}$ C のマイクロヒーティングシステムに移し、蓋を閉じて 5 分間置く
 - c. 氷上に 5 分間置く
 - ・[LS]

サーマルサイクラーにセットし、ATAIL70 プログラムを実行する。

プログラム名	温度 (Lid: 100 $^{\circ}$ C)	時間
[ATAL70] (30 μ L)	37 $^{\circ}$ C	30 min
	70 $^{\circ}$ C	5 min
	4 $^{\circ}$ C	5 min
	4 $^{\circ}$ C	∞

7) アダプターライゲーション

- ① 使用直前に -25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C の貯蔵庫から LIG2 を取り出す
- ② CTL、LIG2、DNA アダプターの順に 2.5 μ L ずつ添加し、十分に混ぜ合わせる
 - ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する
 - ・[LS] 上下にピペッティングする
- ③ 280 $\times$ g で 1 分間遠心する
- ④ 以下のとおりインキュベートする (各ウェルには 37.5 μ L 入っている)
 - ・[HS] 30 $^{\circ}$ C のマイクロヒーティングシステムに蓋を閉じて 10 分間置いた後、氷上に置く
 - ・[LS] サーマルサイクラーにセットし、LIG プログラムを実行する。

プログラム名	温度 (Lid: 100 $^{\circ}$ C)	時間
[LIG] (37.5 μ L)	30 $^{\circ}$ C	10 min
	4 $^{\circ}$ C	∞

8) ライゲーション反応の停止

- ① STL を 600 $\times$ g で 5 秒間遠心する
- ② 各ウェルに STL 5 μ L を添加し、その後しっかり混ぜ合わせる
 - ・[HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する
 - ・[LS] 上下にピペッティングする
- ③ [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する

9) ライゲートした断片の精製

- ① 十分に分散されるまで SPB をボルテックスする
- ② Round1 の容量を用いて、手順 a から m を実施する
 - a. 各ウェルに SPB を添加し、その後十分に混ぜ合わせる

	Round1	Round2
--	--------	--------

CTL は RSB に
代替可能

		SPB	42.5 μ L	50 μ L							
		・ [HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する ・ [LS] 上下にピペッティングする b. 室温で 5 分間インキュベートする c. [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する d. 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する (2 ~ 5 分間) e. 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄する f. 以下のとおり 2 回洗浄する 1. 各ウェルに新しく調製した 80%エタノール (EtOH) 200 μL を添加する 2. 磁気スタンドの上で 30 秒間インキュベートする 3. 各ウェルから上清をすべて取り除いて廃棄する g. 20 μL のピペットを使用して、各ウェルから残っている EtOH を取り除く h. 磁気スタンド上で 5 分間風乾する i. 各ウェルに RSB を添加する <table border="1"> <tr> <td></td><td>Round1</td><td>Round2</td></tr> <tr> <td>RSB</td><td>52.5 μL</td><td>22.5 μL</td></tr> </table> j. 磁気スタンドから取り外し、その後十分に混ぜ合わせる - [HS] 1800 rpm で 2 分間攪拌する - [LS] 上下にピペッティングする k. 室温で 2 分間インキュベートする l. [HS] 280 $\times$ g で 1 分間遠心する m. 磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで放置する (2 ~ 5 分間) ③ 上清 50 μL を CAP プレーットの対応するウェルに移す ④ 新しいプレートで、手順 a から m を、Round2 の容量で繰り返す ⑤ 上澄み液 20 μL を、TSP1 プレーットの対応するウェルに移す				Round1	Round2	RSB	52.5 μ L	22.5 μ L	
	Round1	Round2									
RSB	52.5 μ L	22.5 μ L									
					作業を停止する場合、⑤でプレートを密封し、-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C で最長 7 日間保管可能						

ライブラリー 定量	5.2.2 ライブラリー定量 1) ライブラリーサイズの測定 電気泳動法 (Tapestation, BioAnalyzer 等) もしくは NGS 法 (MiSeq, iSeq 等) で行う ここでは、Tapestation の例を示す 実際は、それぞれの測定機器の推奨マニュアルに従って実施する ① Sample Buffer をよくボルテックスし、スピンドウンする ② Sample Buffer 2 μ L を測定サンプル数分、専用プレートに分注する	
--------------	---	--

- ③ HS D5000 Ladder を軽くボルテックスしスピンドウン後、8 連チューブの 1 番目のウェルに Sample Buffer 4 μ L+ Ladder 4 μ L を分注する
- ④ 専用プレートの各ウェルにキットに対応した濃度に希釈したライブラリーサンプルを 2 μ L ずつ加えシールをしてスピンドウンする
- ⑤ プレート専用ボルテックスで攪拌し(2000 rpm, 60 秒間)、スピンドウンする
- ⑥ 装置にプレート、HS D5000 DNA Screen Tape、チップをセットする
- ⑦ サンプルが分注されているウェルとソフトウェア上のプレートのウェルが一致するよう選択する
- ⑧ チップのふたを外しチップの本数が十分であること及びゴミ箱がきれいなことを確認し、ランをスタートする

2) 品質の確認

2)-1. 電気泳動法の場合

- ① サイズの領域 (Region) を 250~2500bp に設定する
- ② 下表に示すような領域内の平均サイズになっていることを確認する

目的のインサートサイズ	平均サイズの見当
350bp	約 500bp~1000bp
550bp	約 700bp~1200bp

2)-2. NGS 法の場合

インサートサイズの解析を行い、最頻値が目的のインサートサイズ付近にできているか確認する。

3) qPCR によるライブラリー濃度測定

3)-1. KAPA qPCR Master Mix の調製とライブラリー定量

- ① KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 1mL を遮光チューブに分注し、さらにプライマーミックス 200 μ L、ROX Low 40 μ L を添加する
- ② プレートを温度保持ラックの上に置く
- ③ 試薬を混合し qPCR の Master Mix を調製する
- ④ qPCR Master Mix を 16 μ L ずつプレートに分注する
- ⑤ 4 μ L の検量線内に収まるように希釈したライブラリーまたは各スタンダードおよびコントロールをプレートレイアウトに従って添加する
- ⑥ プレートシールを貼り、スピンドウンする
- ⑦ qPCR のプログラムを呼び出し、ランネームを入力する
- ⑧ プレートを QuantStudio 5 にセットする
- ⑨ 「Start RUN」→「***** (機器シリアル番号)」を押して、sds. ファイルを保存した後、下記の反応条件で測定を開始する

温度	時間	サイクル数
95 °C	5 min	-
95 °C	30 sec	35 サイクル
60 °C	90 sec	
Melting Curve 解析		

3)-2. 定量データの解析

	① ラン終了後、各サンプルの増幅曲線の重なりを目視で確認し、三重測定がそろっているか確認する そのうち、外れていると確認できるものは1ポイントのみ除外してよい ② スタンダードカーブが下記の許容基準を満たしていることを確認し、基準を満たさない場合は、上長に報告し対応を協議する PCR 効率：90～110 % R^2：0.99 以上 ③ ネガティブコントロールの Ct 値は検出されていないか、スタンダード6の平均 Ct 値より3以上大きいことを確認し、3未満の場合は、上長に報告し対応を協議する すべて未検出の場合は、基準を満たすこととする ④ qPCR のライブラリー濃度がシーケンス実施可能であることを確認し、下回る場合は上長に報告し対応を協議する	
シーケンス	5.2.3 シーケンス ライブラリー等の条件に合わせて Standard 法もしくは Xp 法のどちらか適切な方法を選択する※ (Standard 法) NovaSeq 6000 のメーカーマニュアル通りに以下の作業を実施する 1) シーケンスサンプルシートの作成 2) ライブラリーの DNA 濃度をノーマライズ ライブラリーが適切な濃度になるように 10 mM Tris-HCl (pH8.5) で希釈する 3) ノーマライズしたライブラリーのプーリング ① ライブラリープール用チューブを用意し、合計 310 μL となるように適量のライブラリーを分注する 4) ライブラリープールの変性と中和 ① ライブラリープール 310 μL に 200 mM NaOH を 77 μL 加え、ボルテックス、スピンドウン後、室温で8分間静置する ② 400 mM Tris-HCl (pH8.0) を 78 μL 加え、ボルテックス、スピンドウンする 5) NovaSeq 6000 によるシーケンス ① 解凍した試薬カートリッジをペーパータオルで水気を取った後、10回以上、転倒混和を実施する ② 空のライブラリーチューブのキャップを外し、変性済みライブラリープールの全量をライブラリーチューブに移す ③ クラスターカートリッジの番号8の位置にライブラリーチューブを挿入する ④ NovaSeq 画面の「Sequence」を開く ⑤ 100%エタノールを染み込ませたレンズペーパーでフローセルとフローセルステージを拭き、汚れを取り除く ⑥ フローセルをフローセルステージに設置する ⑦ NovaSeq の下部を開け、クラスターカートリッジおよび SBS カートリッジを挿入する ⑧ 2つの廃液タンクの廃液を廃棄する ⑨ バッファークートリッジを挿入する ⑩ 画面の案内に従い、適切な情報を入力する	※S4 フローセル以外のフローセルを使用する時は、イルミナ社のマニュアルに従うこと

- ⑪ レビュー画面で目的のシーケンス条件と齟齬がないかを確認後、「Start Run」を押し、シーケンスを開始する

(Xp 法)

NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 を使用し、NovaSeq 6000 のメーカーマニュアル通りに以下の作業を実施する

ExAmp マスターミックスの調製以外の液量は、フローセル 1 レーンあたりに対応した量である

1) シーケンスサンプルシートの作成

2) ライブラリーの DNA 濃度をノーマライズ

ライブラリーが適切な濃度になるように 10 mM Tris-HCl (pH8.5) で希釈する

3) ノーマライズしたライブラリーのプーリング

- ① ライブラリープール用チューブをレーン毎に用意し、1 レーンあたり合計 30 μ L となるように適量を分注する

4) ライブラリープールの変性と中和

- ① ライブラリープール 30 μ L に 200 mM NaOH を 7 μ L 加え、ボルテックス、スピンドウン後、室温で 8 分間静置する
② 400 mM Tris-HCl (pH8.0) を 8 μ L 加え、ボルテックス、スピンドウンする

5) ExAmp マスターミックスの調製及びライブラリープールとの混合

- ① 冷凍庫から ExAmp 試薬を取り出し、10 分間室温で試薬融解後、氷上で静置する
② 100%エタノールを染み込ませたレンズペーパーでフローセルとフローセルドックを拭き、汚れを取り除く
③ NovaSeq 画面の「Sequence」を開く
④ フローセルが NovaSeq に認識されているか、実際に NovaSeq に設置し、確認する
⑤ JP1、JP2、DPX3 をボルテックスする
※試薬は必ず JP1→JP2→DPX3 の順に混ぜる
⑥ 新しい 1.5 mL チューブを用意し、下記、表の順番に必要量添加する

30 秒間ボルテックス、1 分間スピンドウンする

添加順	試薬名	添加量
1	JP1	315 μ L
2	JP2	45 μ L
3	DPX3	165 μ L

※氷上で保管し、1 時間以内に使用する

6) フローセルへのローディング

- ① 変性したライブラリープール 45 μ L に ExAmp マスターミックスを 105 μ L 加え、ボルテックスまたはピペッティングでよく混ぜる
② フローセルとマニュホールドをフローセルドックに設置する
③ ①で調製した試薬添加済みライブラリープール 130 μ L をゆっくりと対応したレーンに流し、反対端に達したことを確認する
※ローディング後、30 分以内にシーケンスのランを開始すること

7) NovaSeq6000 によるシーケンス

- ① 溶解した試薬カートリッジをペーパータオルで水気を取った後、10 回以上、転倒混和を実施する
② 空のライブラリーチューブのキャップを外し、クラスターカートリ

	ッジのライブラリーチューブの位置(番号 8)に挿入する ③ フローセルステージの汚れを取り除き、ローディング済みのフローセルを設置する ④ NovaSeq の下部を開け、クラスターカートリッジおよび SBS カートリッジを挿入する ⑤ 2つの廃液タンクの廃液を廃棄する ⑥ バッファークートリッジを挿入する ⑦ 画面の案内に従い、適切な情報を入力する ⑧ レビュー画面で目的のシーケンス条件と齟齬がないかを確認後、「Start Run」を押し、シーケンスを開始する	
ユニークリード由来の塩基数の算出	5.2.4 ユニークリード由来の塩基数の算出 1) シーケンスが終了し、出力された結果に以下の条件でフィルタリングを行う ① アダプタートリミングを行わない ② 150bp 未満のサイズのリードは切り捨てる 2) 検体毎の fastp から一番正確に duplicate 率を計算できるオプションを選択して Duplicate rate を算出し、ユニークリード由来の塩基数を算出する	

6 章 測定上の注意事項

- 1) 検査作業の際は感染防止のためのグローブ、ゴーグル、マスク、キャップ、専用の実験衣を着用する。
- 2) コンタミネーションの影響が大きいいため、検体、PCR プロダクト等を取扱う際は専用エリア内で注意して操作する。
 - (ア) 原則として試薬のチューブおよびボトルはクリーンベンチ、安全キャビネット内で蓋を開封し取り扱う。
 - (イ) 検査室では専用の実験衣、グローブ、ゴーグル、マスク、キャップを着用する。
 - (ウ) 物品を移動する時にはパスボックスを使用し、必要に応じ UV 照射後に持ち込むことを推奨する。
- 3) コンタミネーションの影響が大きいいため、分注検体は元検体に戻してはならない。
- 4) 期限切れ試薬は使用しない。異なるロットの試薬は混合しない。

7 章 再検基準及び再検手順

検査結果が以下の事項に該当した場合、再検を実施する。

再検基準		再検手順
異常値	シーケンス解析結果から得られたレーン毎の Q30 が 85%未満の場合	ライブラリー作製もしくは NovaSeq による解析より再検査を行う
その他	測定手技の誤り、機器のトラブル、試薬の変質、劣化等、その他管理者が必要と認めた場合	ライブラリー作製もしくは NovaSeq による解析より再検査を行う

8 章 精度管理手順

8.1 内部精度管理

8.1.1 ライブラリー作製精度管理

- ① 精度管理手法
測定毎に管理試料を用いてライブラリー作製を行い、濃度を測定してモニタリングする
- ② 精度管理の手順
管理試料から作製したライブラリーの濃度が $\pm 3SD$ 以内に収まっていることを確認する
- ③ 管理限界
管理試料から作製したライブラリーの濃度が $\pm 3SD$ に収まらない場合、異常と判断する
- ④ 対応法
 - (1) 担当者は上長に報告する
 - (2) 上長は原因を分析し、対応を決定する

8.1.2 シーケンス作製精度管理

- ① 精度管理手法
シーケンス後の Q30 をレーン毎に確認する
- ② 精度管理の手順
シーケンス後のレーン毎の Q30 が 85%以上（メーカー設定値による 2×150 bp の時のクオリティ値判定基準）であればアッセイ系が正常と判断する
- ③ 管理限界
シーケンス後のレーン毎の Q30 が 85%未満であればアッセイ系が異常と判断する
- ④ 対応法
 - (1) 担当者は上長に報告する
 - (2) 上長は原因を分析し、対応を決定する

8.2 外部精度管理

8.2.1 精度管理手法

CAP サーベイに参加し、技能試験を受ける
(以下のテストを推奨する)

Category : Genetics and Molecular Pathology

Proficiency Test : Next-Generation Sequencing (NGS)–Germline Survey)

是正の指摘を受けた場合、可能であれば是正措置を行う

参照：略語一覧

略称	定義	略称	定義
ALP	Adapter Ligation Plate	IMP	Insert Modification Plate
ATL	A-Tailing Mix	LIG	Ligation Mix
CAP	クリーンアップ ALP プレート	LS	ローサンプル
CEP	クリーンアップ末端修復プレート	LT	低スループット
CSP	クリーンアップ剪断 DNA プレート	RSB	Resuspension Buffer
CTA	A-Tailing Control	CTE	End Repair Control
CTL	Ligation Control	SPB	サンプル精製ビーズ
ERP	End Repair Mix	STL	Stop Ligation Buffer
HS	ハイサンプル	TSP1	標的サンプルプレート 1
HT	高スループット		