

November 7, 2013

試薬類

- Qubit dsDNA BR Assay Kit (ライフテクノロジーズ, # Q32850)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ライフテクノロジーズ, # Q32851)
- Qubit ssDNA Assay Kit (ライフテクノロジーズ, # Q10212)
- Agencourt AMPure XP (ベックマンコールター, # A63880)
- 一般的な 10× PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- アジレント RNA 6000 Pico Kit (アジレント, #5067-1513)
- 10 mM Tris-acetate, pH 8.0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
- Klenow Fragment (3'→5' exo-) (NEB, #M0212M)

一般的な濃度の酵素 (5,000 U/ml : NEB, #M0212S や #M0212L) ではなくて、必ず 10 倍濃度標品 (50,000 U/ml: #M0212M) を使用すること

- *Bst* DNA polymerase large fragment (NEB, #M0275S)
- Exonuclease I (NEB, #M0293S)
- Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, #F-540S)
- EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO Research, #D5005)
- Dynabeads M-280 Streptavidin (ライフテクノロジーズ, #112-05D)
- 2× BW(Li) Solution (50 ml)
 - LiCl* 6.3 g
 - 1 M Tris-HCl, pH 8.0 0.5 ml
 - 500 mM EDTA 0.1 ml

*LiCl の溶解は発熱を伴う。溶液の突沸を防ぐため、秤量した LiCl の粉末を 50ml の遠沈管に移した後これを 40ml の水で一気に溶解すると良い。完全に LiCl の粉が溶けた後に Tris と EDTA を加え、水で 50ml にメスアップする。

- 0.1 N NaOH 溶液
10N の NaOH 溶液を使用直前に希釈する。
- KAPA Library Quantification Kit for Illumina (KAPA, # KK4824 あるいは qPCR のプラットフォーム専用の相当品でも良い)
- Hybridization Buffer A (50 ml)

November 7, 2013

- 5 M NaCl 9 ml (最終濃度 900 mM)
- 1 M Tris-HCl, pH 7.4 9 ml (最終濃度 180 mM)
- ddH₂O 32 ml

オリゴヌクレオチド (OPC グレード品が良い)

- Bio-PEA2-N4 (100 μM)

5'-biotin-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN N-3'

- PE-reverse-N4 (100 μM)

5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT NNN N-3'

- PBAT-PE-iX-N4 (いずれも 100 μM)

5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXX XXX GTA AAA CGA CGG

CCA GCA GGA AAC AGC TAT GAC NNN N-3'

下線を引いた 6 塩基を以下のインデックス配列で置換したオリゴヌクレオチドを用意する。これらの配列はイルミナ社 *TruSeq DNA LT Sample Prep Kit* で用いられているインデックス配列の相補鎖に相当するので、これらを用いることによって上記キットと同一インデックス番号をそのまま利用することが出来る。なおインデックス番号 17、24 および 26 は上記キットでも欠番である。

インデックス	配列	インデックス	配列	インデックス	配列
1	CGTGAT	9	CTGATC	18	GCGGAC
2	ACATCG	10	AAGCTA	19	TTTCAC
3	GCCTAA	11	GTAGCC	20	GGCCAC

November 7, 2013

4	TGGTCA	12	TACAAG	21	CGAAAC
5	CACTGT	13	TTGACT	22	CGTACG
6	ATTGGC	14	GGAACT	23	CCACTC
7	GATCTG	15	TGACAT	25	ATCAGT
8	TCAAGT	16	GGACGG	27	AGGAAT

- Primer 3 (100 μ M)

5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC
GAC GCT CTT CCG ATC T-3'

- PBAT-PE-Seq (100 μ M)

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GCA GGA AAC AGC TAT GAC-3'

- PBAT-PE-Idx (100 μ M)

5'-GTC ATA GCT GTT TCC TGC TGG CCG TCG TTT TAC-3'

プラスチック消耗品

- チューブ

➤ 全てのステップにおいて低吸着タイプの 1.5-ml および 0.2-ml のチューブを使用する。

- チップ

➤ ストレプトアビジンビーズをチップ内に吸い込む操作では低吸着タイプのチップを使用する。

November 7, 2013

装置

- DynaMag-2 Magnet (ライフテクノロジーズ) あるいは相当品
- SPRIPlate 96R 磁石プレート(ベックマンコールター)あるいは相当品
- トミーMX-301 冷却微量遠心機あるいは相当品
- アジレント Bioanalyzer 2100
- Qubit Fluorometer or Qubit 2.0 Fluorometer (ライフテクノロジーズ)
- TOMY PMC-060 小型遠心機あるいは相当品
- ABI9700 サーマルサイクラーあるいは相当品
- StepOnePlus リアルタイム PCR システム (アプライドバイオシステムズ) あるいは相当品
- XCell SureLock Mini-Gel (ライフテクノロジーズ)あるいは相当品
- 電気泳動用のパワーサプライ

November 7, 2013

サーマルサイクラーで使用するプログラム

- プログラム 1 (バイサルファイト処理用→セクション II)
 1. 98°C で 10 分
 2. 64°C で 2 時間 30 分
 3. 4°C でソーク
- プログラム 2 (第 1 鎖合成用→セクション III)
 1. 94°C で 5 分
 2. 4°C で 20 分
 3. 4°C から 37°C まで 1°C/分で温度を上げる*
 4. 37°C で 1 時間 30 分
 5. 70°C で 10 分
 6. 4°C でソーク
- プログラム 3 (第 2 鎖合成用→セクション VI)
 1. 94°C で 5 分
 2. 4°C で 20 分
 3. 4°C から 37°C まで 1°C/分で温度を上げる*
 4. 37°C で 30 分
 5. 70°C で 10 分
 6. 4°C でソーク
- プログラム 4 (溶出用→セクション VII)
 1. 94°C で 5 分
 2. 55°C で 15 分
 3. 68°C で 30 分
 4. 4°C でソーク

*サーマルサイクラーで+1°C/分での温度変化の制御が難しい場合は、2ステップのサイクルプログラムを使用してこれを実現することが可能である。最初のサイクルでは 4.0°C-30 秒と 4.5°C-30 秒の 2 ステップを実施し、以降のサイクルではサイクル毎に 1°C ずつそれぞれのステップの温度を上昇させれば、33 サイクル後には 37°C に到達する。

November 7, 2013

I. DNA 濃度の測定 (1 日目)

DNA 濃度の正確な算出は非常に重要である。Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いた定量が手軽で十分な精度がある。OD260 の測定は、この波長領域に他の生体物質の吸収帯が重なり、DNA 量を過大に見積もってしまうため避けること。

1. サンプル DNA の濃度を Qubit dsDNA BR Assay Kit と Qubit Fluorometer を使用して定量する。

II. バイサルファイト処理 (1 日目)

操作が容易であることから、ルーチンワークでは 100ng 程度の DNA を開始量にすると良い。しかし、鑄型調製は~1ng 程度から始めるのが最も効率的であるため、より効率的な調製を行う必要がある場合は、バイサルファイト処理後の DNA をいくつかのチューブに分けたうえで第 1 鎖合成 (ステップ III) に取りかかると良いだろう。以下のプロトコールは、ZYMO Research 社の EZ DNA Methylation-Gold Kit に基づくが一部変更箇所がある。

1. 900 μ l のミリ Q 水、50 μ l の M-Dissolving Buffer および 300 μ l の M-Dilution Buffer を CT Conversion Reagent のチューブに加え、混合する

高収率で効率的なバイサルファイト処理を行うためには、CT Conversion Reagent は用時調製すべきである。

2. CT Conversion Reagent のチューブを室温で 10 分間ローテーターに設置して十分溶解させる
3. 以下の内容を混合する

CT Conversion Reagent	130 μ l
ミリ Q 水	(20 - x) μ l
サンプル DNA	x μ l

4. 上記溶液を 50 μ l ずつ 3 本の 0.2-ml チューブに分注する
5. サーマルサイクラーにセットしプログラム 1 を開始する
6. キット付属のスピンカラムをコレクションチューブに乗せ、600 μ l の M-Binding Buffer をカラムに分注する

November 7, 2013

7. ステップ 5 の処理が終わったサンプルをカラムに添加した M-Binding Buffer に全量加えた後、キャップを閉めて、数回転倒混和を行って十分混合する
8. 微量遠心機の最高回転数($\geq 10,000 \times g$)で 30 秒間遠心する
9. フロースルーを再度カラムに乗せる

EZ DNA Methylation-Gold キットに付属するシリカカラムでは、時々、溶液がレジンと接触しないままにスッポ抜けることがある。確実に DNA を回収するために、カラムの状態をよく確認してから操作を始めること。上記のようにフロースルーを再度カラムに乗せて遠心する操作はこのような事故をなるべく少なくするための工夫の一つである。

10. 微量遠心機の最高回転数で($\geq 10,000 \times g$) 30 秒間遠心する
11. フロースルーを捨てる
12. 100 μ l の M-Wash Buffer を加え、微量遠心機の最高回転数で 30 秒間遠心し、フロースルーを捨てる
13. 200 μ l の M-Desulphonation Buffer をカラムに乗せ、室温で 15 分間インキュベーションを行う
14. 微量遠心機の最高回転数で 30 秒間遠心し、フロースルーを捨てる
15. 200 μ l の M-Wash Buffer をカラムに乗せ、最高回転数で 30 秒間遠心し、フロースルーを捨てる
16. ステップ 15 をもう一度繰り返し、カラムを空の新しいチューブに乗せる
17. 22 μ l の M-Elution Buffer を直接レジンに乗せ、室温で 2 分間インキュベーションした後、最高回転数で 30 秒間遠心して DNA を溶出する

溶出の容積 (22 μ l) には *Qubit ssDNA Assay Kit* での定量のための 1 μ l と *RNA 6000 Pico Kit* を用いたアジレント *Bioanalyzer* でのクオリティチェック (QC) のための 1 μ l が含まれている。30 ng 以下の DNA から鋳型調製を開始した場合には、*Qubit* も *Bioanalyzer* も検出限界以下になるなので、これらの QC ステップは省き、ステップ 16 の溶出容積を 20 μ l に減らす。なお、上記操作による通常の収率は開始 DNA の 30% から 70% である。また、得られる DNA は 100~1,000 nt で 600 nt にピークを有するスメアパターンを示す。

バイサルファイト処理後の DNA は不安定であることから、このステップで実験を停止してはならない。次の第 1 鎖合成に最適な停止点があるので、そこまで進めること。

III. 第 1 鎖合成 (1 日目)

1. 以下の第 1 鎖合成用反応溶液を準備する

November 7, 2013

10× NEBuffer 2	5 μ l
2.5 mM dNTPs	5 μ l
ミリ Q 水	16 μ l
Bio-PEA2-N4 (100 μ M)	4 μ l
バイサルファイト処理済 DNA	20 μ l

- チューブをサーマルサイクラーに乗せプログラム 2 を開始する
- プログラム 2 のステップ 2 (4°C でのインキュベーションステップ) の開始 5 分後にプログラムをポーズさせ、チューブをサーマルサイクラーから取り出し、1.5 μ l の Klenow Fragment (3'→5' exo-) (10 倍濃度品) を上記溶液に添加し、よく混合する
- チューブをサーマルサイクラーに再び乗せ、停止していたプログラム 2 を再開させ、第 1 鎖合成を進める

この部分が実験の停止に適した部分である。酵素を加えた後はサーマルサイクラーのプログラムに任せて次の日まで鑄型調製のことは忘れてしまおう。なお、反応後のチューブは 4°C あるいは -20°C で保存可能である。これは、このステップではバイサルファイト処理 DNA が 2 本鎖化されており、かつ過剰量のプライマーがチューブ壁への吸着による損失を抑えてくれる効果によるものと考えられる。

IV. 過剰なプライマーの除去 (2 日目)

- 第 1 鎖合成の反応液 (~50 μ l) を新しい 1.5-ml のチューブに移し、50 μ l の AMPure XP を添加してよく混合する

この混合量比 (つまり DNA 溶液: AMPure XP 比 = 1:1) では 200 bp 以下の DNA 断片が効率的に除かれる。第 1 鎖合成で合成された DNA は 200 bp 以上の断片である一方で、プライマーダイマー等のサイズは 100 bp 以下である。

- チューブを室温で 10 分間インキュベーションする
- チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く

November 7, 2013

4. 200 μ l の 75%エタノールを加えてビーズを洗浄し、再び除く
5. 45 μ l の 10 mM Tris-acetate (pH 8.0)を加えてボルテックスし、ビーズをよく分散させる
6. 軽く遠心した後、チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集める
7. 上清を新しい1.5-mlのチューブに移し、5 μ l の 10 \times PCR Buffer と 50 μ l の AMPure XP を加え、よく混合して軽くスピンドウンする

10 \times PCR Buffer を加えると *AMPure XP* による精製の再現性と回収率が良くなる。

8. チューブを室温で 10 分間インキュベーションする
9. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
10. 200 μ l の 75%エタノールを加えてビーズを洗浄し、再び除く
11. 51 μ l の 10 mM Tris-acetate (pH 8.0)を加え、ボルテックスでよくビーズを分散させ、軽くスピンドウンして、チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集める
12. 上清を新しい 1.5-ml チューブに移す
13. 上清を 1 μ l 使い Qubit dsDNA HS Kit を用いて DNA の量を定量する

このステップの典型的な収率は、開始 DNA 量の 40%~60%の値となる。30 ng 以下の DNA から鑄型調製を開始した場合には Qubit の定量限界以下になるのでこのステップを省略し、ステップ 11 における溶出の容積を 50 μ l に減らす。

V. ビオチン化標識された DNA のストレプトアビジンビーズ上への

キャプチャー (2日目)

1. よく懸濁した Dynabeads M280 ストレプトアビジンビーズ 20 μ l を 1.5-ml チューブに取り、チューブをマグネットスタンドに立てる
2. 上清を除き、2 \times BW(Li) solution を 50 μ l 加えてビーズを懸濁する
3. セクション IV の溶出 DNA に対して、ビーズ懸濁液を加える
4. 室温でゆっくり回転させながらインキュベーションする
5. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く

November 7, 2013

6. 180 μ l の 2 \times BW(Li) solution をビーズに加え、ボルテックス後軽くスピンドウンする
7. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
8. 180 μ l の 0.1 N NaOH 溶液を加えてボルテックスし、室温で2分間インキュベーションし、軽くスピンドウンする
9. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
10. ステップ 8 と 9 をもう一度繰り返す
11. 180 μ l の 2 \times BW(Li) solution をビーズに加え、ボルテックス後軽くスピンドウンする
12. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
13. 180 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) をビーズに加え、ボルテックス後軽くスピンドウンする

VI. 第2鎖合成 (2日目)

1. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
2. 以下の試薬を混ぜ、第2鎖合成用反応溶液を準備する

10 \times NEBuffer 2	5 μ l
2.5 mM dNTPs	5 μ l
ddH ₂ O	36 μ l
PE-reverse-N4 (100 μ M) (シングルエンド用)	4 μ l
PBAT-PE-iX-N4 (100 μ M) (インデックス付ペアエンド用)	

3. ビーズをボルテックスで懸濁し、ビーズ懸濁液を新しい 0.2-ml チューブに移す
4. サーマルサイクラーにチューブをセットしプログラム 3 を開始する
5. プログラム 3 のステップ 2 (4 $^{\circ}$ C でのインキュベーションステップ) の開始 5 分後にプログラムをポーズさせ、チューブをサーマルサイクラーから取り出し、1.5 μ l の Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' exo $^{-}$) (10 倍濃度品) を上記溶液に添加し、よく混合する

November 7, 2013

- チューブをサーマルサイクラーに再び乗せ、停止していたプログラム 3 を再開させ、第 2 鎖合成を進める

VII. 後追い反応 (2日目)

- チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
- 以下の試薬をまぜ、後追い反応溶液を調製し、ビーズに加える

10× ThermoPol Buffer	5 µl
2.5 mM dNTPs	5 µl
ddH ₂ O	40 µl
<i>Bst</i> DNA polymerase large fragment	1 µl

- 65°C で 30 分間インキュベーションする

VIII. 鋳型 DNA の溶出/二本鎖化 (2日目)

- チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
- 以下の試薬を混合して溶出/二本鎖化反応液を調製する

5× Phusion HS Buffer	10.0 µl
2.5 mM dNTPs	5 µl
ddH ₂ O	35 µl
Primer 3 (100 µM)	0.4 µl
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	1 µl

このステップには、溶出される DNA を二本鎖化して SPRI ビーズによるサイズ分画を再現性良くするのみならず、イルミナシーケンサでのブリッジ PCR に必要なプライマー配列を鋳型に導入する目的もある。

- プログラム 4 を開始する

November 7, 2013

4. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を新しい 1.5-ml チューブに移す
5. Exonuclease I を1 μ l 加え、37°Cで 30 分間と 70°Cで 10 分間インキュベーションする
6. 溶出 DNA の1 μ l を Qubit dsDNA HS Kit を使って定量する

IX. サイズ分画 (2日目)

1. 溶出した DNA (50 μ l)に 50 μ l の AMPure XP を加え、混合して軽くスピンドウンする
2. 室温で 10 分間インキュベーションする
3. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
4. 200 μ l の 75%エタノールを加えてビーズを洗浄し、再び除く
5. 45 μ l の 10mM Tris-acetate (pH 8.0)を加えてボルテックスし、ビーズをよく分散させる
6. 軽く遠心した後、チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集める
7. 上清を新しい1.5-mlのチューブに移し、5 μ l の 10 \times PCR Buffer と 50 μ l の AMPure XP を加え、よく混合して軽くスピンドウンする
8. チューブを室温で 10 分間インキュベーションする
9. チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集め、上清を除く
10. 200 μ l の 75%エタノールを加えてビーズを洗浄し、再び除く
11. 22 μ l の 10 mM Tris-acetate (pH 8.0)を加え、ボルテックスでよくビーズを分散させ、軽くスピンドウンして、チューブをマグネットスタンドに立ててビーズを集める
12. 上清を新しい 1.5-ml チューブに移す
13. 上清を 1 μ l 使って Qubit dsDNA HS Kit を用いて DNA 量を定量する

通常、このステップの収率は開始 DNA の 20%~40%である。30 ng 以下の DNA から開始した場合には定量の限界以下になるのでこの QC のステップを省き、ステップ 9 の溶出容積を 21 μ l に減らす。

November 7, 2013

X. qPCR による鋳型 DNA の定量 (3 日目)

1. 適切な qPCR 法を用いて、鋳型中の有効鋳型分子のモル量を正確に測定する

ステップ IX で得られる DNA 溶液中には鋳型分子の他に 10 倍量程度の副産物が含まれている。したがって、蛍光法ではなくて、qPCR による定量を利用して、正確な濃度を求めることが非常に重要である。我々は再現性の高さから *Library Quantification Kits for Illumina (KAPA biosystems)* を説明書にしたがって使用している。この時の収量は通常開始 DNA の 2~8% 程度である。100 ng の DNA から開始した場合、通常、20 fmol 程度の鋳型分子に相当する鋳型が得られることになる。これは、イルミナ HiSeq 2000 なら 20 レーン分、MiSeq ならば 4 レーン分の配列決定に十分な鋳型量である。

副産物の存在は、電気泳動による鋳型 DNA 分子のサイズ決定も困難にする。そこで鋳型そのものではなくて、その qPCR 産物を TBE-Urea 系の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると良い。通常、300 nt にピークを有する 200~500 nt のサイズ分布を示す。

XI. 配列決定 (3 日目)

インデックス付ペアエンドシーケンスを行う際には、PBAT-PE-Seq をリード 2 用プライマーミックスに、PBAT-PE-Idx をインデックス用プライマーミックスに、それぞれ最終濃度 0.5 μ M になるように添加すること。

配列決定に必要な鋳型量の決定

1. クラスター形成に必要な鋳型量を以下の式とパラメータを用いて計算する

装置名	HiSeq 2000 HiSeq 2500 <i>High Output</i> モード	HiSeq 2500 <i>cBot</i> を使う <i>Rapid Run</i> モード	HiSeq 2500 <i>cBot</i> を使わ ない <i>Rapid</i> モ ード、または MiSeq
目標とする鋳型の最終濃度 (pM)	10*		

November 7, 2013

目標とする鋳型溶液の体積 (μl)	120	70	480
希釈前の鋳型のモル濃度 (pM)	Y		
加える鋳型の体積 = x (μl)	$\frac{120 \times 10}{y}$	$\frac{70 \times 10}{y}$	$\frac{480 \times 10}{y}$

*10 pM から鋳型濃度の最適化を行うのが良いだろう

cBot を用いる HiSeq 2000 あるいは HiSeq 2500 High Output Mode 用の プロトコール (1 レーン分)

1. Hybridization Buffer A を 1.5-ml チューブに分注し、氷上に置く
2. 2 N の NaOH 溶液を 10 N の NaOH 溶液を 5 倍希釈して用意する
3. 配列決定用の鋳型を以下の組成で混ぜ、変性させる

鋳型 DNA 溶液	x μl
ddH ₂ O	(19 - x) μl
2 N NaOH 溶液	1 μl

4. 室温で 5 分間インキュベーションする
5. 100 μl の氷冷した Hybridization Buffer A を変性させた鋳型に加え、混合して氷上に置く
6. イルミナ社のプロトコールに従いクラスター形成を行う

バイサルファイト変換された DNA では極端に偏った塩基組成のために蛍光シグナルの補正がうまくゆかないので、フローセル中の 1 レーンを *phiX* コントロールに充てねばならない。

cBot を用いる HiSeq 2500 Rapid Run Mode 用のプロトコール (1 レーン分)

1. Hybridization Buffer A を 1.5-ml チューブに分注し、氷上に置く
2. 2 N の NaOH 溶液を 10 N の NaOH 溶液を 5 倍希釈して用意する
3. 配列決定用の鋳型を以下の組成で混ぜ、変性させる

鋳型 DNA 溶液	x μl
ddH ₂ O	(11 - x) μl
2 N NaOH 溶液	0.6 μl

4. 室温で 5 分間インキュベーションする

November 7, 2013

5. 58 μ l の氷冷した Hybridization Buffer A を変性させた鋳型に加え、混合して氷上に置く
6. イルミナ社のプロトコールに従い用意した 70 μ l の 8 pM phiX コントロール溶液を加え混合する

HiSeq 2500 の *Rapid Run Mode* では蛍光シグナル補正のためのコントロールレーンが無いので、コントロールとなる鋳型(phiX コントロール)をサンプルに混ぜて配列決定せねばならない

7. イルミナ社のプロトコールに従いクラスター形成を行う

cBot を用いない HiSeq 2500 Rapid Run Mode あるいは MiSeq 用のプロトコール

1. Hybridization Buffer A を 1.5-ml チューブに分注し、氷上に置く
2. 2 N の NaOH 溶液を 10 N の NaOH 溶液を 5 倍希釈して用意する
3. 配列決定用の鋳型を以下の組成で混ぜ、変性させる

鋳型 DNA 溶液	x μ l
ddH ₂ O	(76 - x) μ l
2 N NaOH 溶液	4 μ l

4. 室温で 5 分間インキュベーションする
5. 400 μ l の氷冷した Hybridization Buffer A を変性させた鋳型に加え、混合して氷上に置く
6. イルミナ社のプロトコールに従い用意した 120 μ l の 8 pM phiX コントロール溶液を加え混合する

HiSeq 2500 の *Rapid Run Mode* や *MiSeq* では蛍光シグナル補正のためのコントロールレーンが無いので、コントロールとなる鋳型(phiX コントロール)をサンプルに混ぜて配列決定せねばならない

7. イルミナ社のプロトコールに従いクラスター形成を行う

November 7, 2013

文献

Miura, F., Enomoto, Y., Dairiki, R. & Ito, T. (2012) Amplification-free whole genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res.* 40, e136.

Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochizuki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y. & Kono, T. (2013) High resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Res.* 23, 616–627.

Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., Kono, T. & Sasaki, H. (2013) Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 9, e1003439.