

illumina®

Illumina COVIDSeq RUO Kits

Reference Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000126053 v09 JPN

2024 年 11 月

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断目的での使用はできません。

本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、他の目的で使用・配布したり、イルミナの書面による事前の同意なしに送付・開示・複製することを禁じます。本文書により、イルミナが、当社の特許権・商標権・著作権・慣習法に基づく権利や、第三者の同様の権利の下で、ライセンスを譲渡することはありません。

本文書に記載されている製品が正しく安全に使用されるよう、資格要件を満たし、適切に訓練を受けた担当者が、本文中の手順に厳格かつ明確に従わなければなりません。これらの製品を使用する前に、本文書の内容をすべて読み、理解しなければなりません。

本文中の手順をすべて読まず、明確に従わない場合は、製品が損傷したり、使用者や他の人に被害が及んだり、他の資産が損傷したりするおそれがあり、これらの製品に適用される保証が無効となります。

イルミナは、本文書に記載されている製品（それらの部品やソフトウェアも含む）の不適正使用によって生じた責任は一切負いません。

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

商標はすべて、Illumina, Inc. または各所有者の所有物です。商標に関する詳細は、jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

目次

| | |
|---|----|
| 概要 | 1 |
| はじめに | 1 |
| インプットに関する推奨事項 | 1 |
| ライブラリー調製 | 2 |
| はじめに | 2 |
| ヒントとテクニック | 3 |
| RNA 抽出 | 4 |
| RNA のアニーリング | 5 |
| 1st strand cDNA 合成 | 6 |
| cDNA 増幅 | 7 |
| PCR アンプリコンのタグメンテーション | 9 |
| タグメンテーション後のクリーンアップ | 10 |
| タグメンテーションしたアンプリコンの増幅 | 12 |
| ライブラリーのプーリングとクリーンアップ | 13 |
| ライブラリーの定量とノーマライゼーション | 16 |
| ライブラリーのプーリングと希釈 | 17 |
| シーケンスの準備 | 18 |
| 消耗品および機器 | 20 |
| Illumina COVIDSeq Assay Kit (96 Samples) の内容 | 20 |
| Illumina COVIDSeq Test (RUO) Kit (3072 Samples) の内容 | 22 |
| 消耗品および機器 | 24 |
| COVIDSeq Positive Control の調製 | 28 |
| COVIDSeq Positive Control の調製 | 28 |
| 改訂履歴 | 31 |
| テクニカルサポート | 34 |

概要

| | |
|--------------------|---|
| はじめに | 1 |
| インプットに関する推奨事項..... | 1 |

はじめに

本ガイドでは、2 種類の研究用キット、Illumina COVIDSeq Test (RUO) と Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) のいずれかを用いた SARS-CoV-2 ウイルスを検出する方法について解説します。Illumina COVIDSeq Test はハイスルーブット (HT) シーケンス、Illumina COVIDSeq Assay はロースルーブット (LT) シーケンスのためのサンプル処理に適しています。

Illumina COVIDSeq Test では、NovaSeq 6000 システムを用いた場合には最大 3,072 個、NextSeq 500/550 システム、RUO モードの NextSeq 550Dx システム、NextSeq 1000/2000 システムのいずれかを用いた場合には最大 384 個のサンプルを調製することができます。Illumina COVIDSeq Assay では、iSeq 100 システム、MiSeq システム、MiniSeq システムのいずれかを用いて、最大 96 個のサンプルを調製することができます。

インプットに関する推奨事項

Illumina COVIDSeq Test (RUO) および Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) は、鼻咽頭 (NP) スwab、中咽頭 (OP) スwab、鼻腔スwab、廃水に由来するサンプルに対応しています。サンプルは、お住まいの地域の病原体輸送に関する管理規制に従って輸送します。

サンプルは、サンプル輸送に使用するチューブの製造業者指定の方法に従って保管します。長期にわたる保管は検査結果に悪影響を及ぼします。推奨抽出キットとしては QIAamp Viral RNA Mini Kit または Quick-DNA/RNA Viral Magbead Kit があります。

以下のサンプル要因が SARS-CoV-2 検出に影響を及ぼすことがあります。

- サンプル採取方法、患者要因、感染段階。
- 輸送や保管中のウイルス RNA の分解。RNA の分解により偽陰性の結果が生じる可能性があります。

! | 検体はすべて、感染性病原体として取扱ってください。

ライブラリー調製

| | |
|----------------------------|----|
| はじめに | 2 |
| ヒントとテクニック | 3 |
| RNA 抽出 | 4 |
| RNA のアニーリング | 5 |
| 1st strand cDNA 合成 | 6 |
| cDNA 増幅 | 7 |
| PCR アンプリコンのタグメンテーション | 9 |
| タグメンテーション後のクリーンアップ | 10 |
| タグメンテーションしたアンプリコンの増幅 | 12 |
| ライブラリーのプーリングとクリーンアップ | 13 |
| ライブラリーの定量とノーマライゼーション | 16 |
| ライブラリーのプーリングと希釈 | 17 |
| シーケンスの準備 | 18 |

はじめに

本章では、Illumina COVIDSeq Test (RUO) か、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) のいずれかを用いたライブラリー調製について解説します。

- キットの中身を確認し、必要な機器と消耗品が揃っていることを確認してください。[20ページの「消耗品および機器」](#)を参照してください。

i | 2つのキットは試薬ラベルの名称にわずかな違いがあります。Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットの試薬には、ハイスループットシーケンス用であることを示す、「HT」と記載されたラベルが貼付されています。Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) の試薬には、「HT」の表記はありません。また、Illumina COVIDSeq Test (RUO) で「ITB」とラベルされた試薬は、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) で「IPB」とラベルされています。

- 規定の分量およびインキュベーションパラメータを用いて、記載順にプロトコールを実行してください。
- 試薬の使用期限が切れていないことを確認してください。使用期限切れの試薬を使用すると、性能に悪影響が及ぶことがあります。
- Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)を用いる場合や、サーベイランスにIllumina COVIDSeq Test (RUO)を用いる場合は、品質管理上、プレートなしのコントロール (NTC) と陽性コントロールの使用が推奨されますが、必須ではありません。調製に関する手順については、[28ページの「COVIDSeq Positive Control の調製」](#)を参照してください。陽性コントロールは、Illumina COVIDSeq TestとIllumina COVIDSeq Assayのどちらにも同梱されていません。イルミナから別途入手できます (製品番号: 20041775)。
- Illumina COVIDSeq Test (RUO)でライブラリー調製を複数回行う場合は、イルミナのテクニカルノート『Aliquot Procedure for Illumina COVIDSeq Test (RUO version) Kit Reagents』を参照してください。

- -20°Cに保管された試薬の凍結融解サイクルは8回を超えないようにしてください。
- プーリング後はできる限りすぐにライブラリーのシーケンスを実施してください。プーリングされたライブラリーは、-25°C～-15°Cで最長 30 日間安定状態にあります。

ヒントとテクニック

プロトコールに安全なストップポイントが指定されていない場合は、ただちに次のステップに進みます。

コンタミネーションの予防

- ヌクレアーゼやPCR産物のコンタミネーションを防ぐため、適切な研究室業務を実践してください。ヌクレアーゼや PCR 産物のコンタミネーションにより、不正確で信頼性のない結果となることがあります。
- ライブラリー調製は RNase/DNase フリーの環境で行ってください。作業エリアを RNaseZap や DNAZap などの RNase/DNase 阻害剤でしっかり除染してください。
- サンプル間や試薬の分注時には、新しいチップと新しい消耗品を使用してください。
- キャリーオーバーやサンプル間クロスコンタミネーションのリスクを軽減するため、フィルター付きチップを使用してください。
- コンタミネーションの可能性があるため、細心の注意を払って、ウェルの内容物がウェル内に完全に収まっていることを確認してください。内容物を飛び散らせないでください。
- ライブラリー調製を行う際にエアロゾルのブリーチスプレーを使用しないでください。微量のブリーチ剤の混入でもアッセイの失敗につながる可能性があります。
- プレ PCR 環境からポスト PCR 環境に移動する場合には、一方向のワークフローを用いてください。
- プレートごとに 1 個以上のテンプレートなしのコントロール（NTC）を用いてコンタミネーションをモニタリングすることを推奨します。

プレートの密封と開封

- 本プロトコールでは、以下のステップの前に、必ず 96 ウェルプレートをシールしてください。
 - 攪拌ステップ
 - ボルテックスステップ
 - 遠心ステップ
 - サーマルサイクリングステップ
- プレートをシールするには、プレートに粘着カバーをし、ウェッジやゴムローラーで密閉してください。
- クロスコンタミネーションや蒸発のリスクを軽減するため、端とウェルが完全にシールされていることを確認してください。
- Microseal 'B'粘着シールは-40°C～110°Cで効果があり、スカート付きまたはセミスカート付きのPCRプレートに適しています。Microseal 'B' は、攪拌、遠心、長期保管に使用してください。

- 開封前：
 - 96 ウェルプレート を 1,000 × g で 1 分間遠心してください。ビーズステップでは、500 × g で 1 分間遠心してください。
 - プレートを平らな所に置き、ゆっくり開封してください。

プレートの移動

- プレート間で溶液を移す場合、指定された容量をプレートの各ウェルから別のプレートの対応するウェルに移します。
- もしビーズがピペットチップに吸引されてしまった場合は、磁気スタンド上のプレートに戻し直し、液体が透明になるまで待ってください（～ 2 分間）。

遠心分離

- 本手順のすべてのステップにおいて、液体やビーズをウェル底部に集め、サンプルロスを防ぐため、必要に応じて遠心してください。

ビーズの取扱い

- ビーズ懸濁液を、液体がはねたり、気泡が生じたりしないように、ゆっくりピペティングしてください。
- 混合する際は、しっかり混合してください。
- サンプルロスを避けるため、再懸濁ステップと混合ステップの後にはピペット先端にビーズが残っていないことを確認してください。
- ビーズを洗浄する際：
 - プレートに合ったマグネットを使用してください。
 - ウェルの側面に張り付いているビーズが濡れるように溶液を分注してください。
 - プレートはマグネットから取り外すよう指示されるまで磁気スタンドに載せたままにしてください。
 - 磁気スタンドに載せている間はプレートを攪拌しないでください。ビーズペレットを動かさないでください。

RNA 抽出

このステップでは、不活化済みウイルス輸送培地チューブから RNA を抽出します。Quick-DNA/RNA Viral MagBead (Zymo Research 社、製品番号 R2141) か、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社、製品番号 52906) のいずれかを用いて RNA を抽出することができます。使用する抽出法に対応する手順に従ってください。

COVIDSeq Positive Control を使用する場合は、必ず、[28 ページの「COVIDSeq Positive Control の調製」](#)の調製手順に従ってください。

消耗品

- [QIAamp Viral RNA Mini Kit] 1.7 mL LoBind チューブ
- [Quick-DNA/RNA Viral MagBead] 2000 µL 96 ディープウェルプレート

Quick-DNA/RNA Viral MagBead の手順

1. 臨床由来のサンプルごとに400 μ Lのサンプルを新しいディープウェルプレートに添加します。廃水サンプルの場合は、抽出キットの取扱説明書で認められている最大量を添加します。

コントロールを使用する場合、希釈した CPC（陽性コントロール）と ELB（テンプレートなしのコントロール）をサンプルバッチ当たり各 1 チューブ含めます。

2. RNA 抽出には Quick-DNA/RNA Viral MagBead を使用します。詳細については、Zymo Research 社の *Quick-DNA/RNA Viral MagBead* の取扱説明書を参照してください。

以下のプロトコールオプションを用いてください。

- MagBinding Beads を添加する前に、上下に 10 回ピペティングして混合します。
- MagBinding Beads 20 μ L を添加後、上下に 10 回ピペティングして混合し、1500 rpm で 10 分間攪拌します。

QIAamp Viral RNA Mini Kit の手順

1. 臨床由来のサンプルごとに 140 μ Lのサンプルを新しい 1.7 mLマイクロチューブに添加します。廃水サンプルの場合は、抽出キットの取扱説明書で認められている最大量を添加します。

コントロールを使用する場合、希釈した CPC（陽性コントロール）と ELB（テンプレートなしのコントロール）をサンプルバッチ当たり各 1 チューブ含めます。

2. RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用します。詳細については、QIAGEN 社のウェブサイトにある『QIAamp Viral RNA Mini Handbook』（文書番号：HB-0354-007）を参照してください。

以下のプロトコールオプションを用いてください。

- スピンプロトコールを用いてウイルス RNA を精製します。
- 溶出液を 1 分以上インキュベーションします。
- 60 μ L ではなく 30 μ L の Buffer AVE で溶出させます。

RNA のアニーリング

このプロセスでは、cDNA 合成の準備のためランダムヘキサマーとともに抽出した RNA をアニーリングします。

COVIDSeq Positive Control を使用する予定があり、まだコントロールを調製していない場合、適切な手順に従うため [28 ページの「COVIDSeq Positive Control の調製」](#)を確認してください。

消耗品

- EPH3 (Elution Prime Fragment 3HC Mix)
- 96 ウェル PCR プレート
- Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

- 使用前に毎回ボルテックスにかけてください

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|------|---------------|-----------------|
| EPH3 | -25°C ~ -15°C | 室温で融解し、転倒混和します。 |

2. 以下の COVIDSeq Anneal プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - 「リッドのプレヒート」オプションを選択します
 - 反応量を 17 μ L に設定します
 - 65°C で 3 分間
 - 4°C で保持します

手順

1. 新しい PCR プレートに CDNA1 とラベルします。
2. 各ウェルに EPH3 を 8.5 μ L 添加します。
3. 各ウェルに溶出サンプルを 8.5 μ L 添加します。
4. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
5. 1,000 \times g で 1 分間遠心します。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーにセットし、COVIDSeq Anneal プログラムを実行します。

1st strand cDNA 合成

このステップでは、逆転写酵素を用いてランダムヘキサマーをアニーリングさせた RNA 断片を 1st strand cDNA に逆転写します。

消耗品

- FSM (First Strand Mix)
- RVT (Reverse Transcriptase)
- 1.7 mL チューブ (96 ウェルサンプルプレート当たり1本)
- Microseal 'B' 粘着シール

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-----|---------------|----------------------------|
| FSM | -25°C ~ -15°C | 融解して室温に戻します。転倒混和し、氷上保存します。 |
| RVT | -25°C ~ -15°C | 使用前に転倒混和します。氷上保存します。 |

2. 以下の COVIDSeq FSS プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- 「リッドのプレヒート」オプションを選択します
- 反応量を 25 µL に設定します
- 25°C で 5 分間
- 50°C で 10 分間
- 80°C で 5 分間
- 4°C で保持します

手順

1. 1.7 mL チューブ内で、以下の分量を混合して First Strand cDNA Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプルの数を掛けます。

- FSM (9 µL)
- RVT (1 µL)

試薬は多少のピペッティングエラーを考慮して多めに含まれています。

2. CDNA1 プレートの各ウェルに、Master Mix を 8 µL 添加します。
3. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
4. 1,000 × g で 1 分間遠心します。
5. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーにセットし、COVIDSeq FSS プログラムを実行します。

安全なストップポイント

手順を停止する場合、プレートをシールし、-25°C ~ -15°C で最長 7 日間保管できます。

cDNA 増幅

このステップでは、PCR 反応を 2 つに分けて cDNA を増幅します。

消耗品

- IPM (Illumina PCR Mix)
- C5P1 (COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 1)
- C5P2 (COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 2)

- ヌクレアーゼフリー水
- 15 mL チューブ (96 ウェルサンプルプレート 4 個当たり2 本)
- 96 ウェル PCR プレート (2 個)
- Microseal 'B' 粘着シール

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|------|---------------|------------------------------|
| C5P1 | -25°C ~ -15°C | 室温で融解します。使用時まで氷上保存します。 |
| C5P2 | -25°C ~ -15°C | 室温で融解します。使用時まで氷上保存します。 |
| IPM | -25°C ~ -15°C | 室温で融解し、転倒混和します。使用時まで氷上保存します。 |

2. 以下の COVIDSeq PCR プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- 「リッドのプレヒート」オプションを選択します
- 反応量を 25 µL に設定します
- 98°C で 3 分間
- 以下で 35 サイクル：
 - 98°C で 15 秒間
 - 63°C で 5 分間
- 4°C で保持します

手順

1. 新しい PCR プレート 2 枚に、COV1 および COV2 とラベルします。

これらのプレートは、CDNA1 プレート内のサンプルとコントロールに対して、PCR を 2 つに分けて反応させるためのものです。

2. 15 mL チューブ内で、以下の分量を混合して、COVIDSeq PCR 1 Master Mix および COVIDSeq PCR 2 Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプルの数を掛けます。

試薬は多少のピペッティングエラーを考慮して多めに含まれています。

| 試薬 | COVIDSeq PCR 1 Master Mix (µL) | COVIDSeq PCR 2 Master Mix (µL) |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|
| IPM | 15 | 15 |
| C5P1 | 4.3 | N/A |
| C5P2 | N/A | 4.3 |
| ヌクレアーゼフリー水 | 4.7 | 4.7 |

3. CDNA1 プレートの各ウェルに対応する COV1 プレートの各ウェルに、COVIDSeq PCR 1 Master Mix を 20 µL 添加します。

4. CDNA1 プレートの各ウェルから、COV1 プレートの対応するウェルに、1st strand cDNA 合成反応液を5 μ L 添加します。
5. CDNA1 プレートの各ウェルに対応する COV2 プレートの各ウェルに、COVIDSeq PCR 2 Master Mix を20 μ L 添加します。
6. CDNA1 プレートの各ウェルから、COV2 プレートの対応するウェルに、1st strand cDNA 合成反応液を5 μ L 添加します。
7. シールし、1600 rpm で1分間攪拌します。
8. 1,000 x g で1分間遠心します。
9. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーにセットし、COVIDSeq PCR プログラムを実行します。

安全なストップポイント

手順を停止する場合、プレートをシールし、-25°C ~ -15°Cで最長3日間保管できます。

PCR アンプリコンのタグメンテーション

このステップでは、EBLTS を使って PCR アンプリコンのタグメンテーションを実施します。タグメンテーションとは、PCR アンプリコンを断片化して、アダプター配列をタグ付けするプロセスです。

消耗品

- EBLTS (Enrichment BLT)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- ヌクレアーゼフリー水
- 1.7 mL チューブ
- 15 mL チューブ (96 ウェルサンプルプレート 4 個あたり1本)
- 96 ウェル PCR プレート
- Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

- EBLTSは、2°Cを超える温度で、直立状態で保管します。ビーズがバッファーに常に完全に浸かるようにします。
- ビーズが96 ウェルプレートの側面や上部に付着している場合、500 x g で1分間の遠心後、ピペティングで懸濁します。

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-------|---------------|----------------------------|
| EBLTS | 2°C ~ 8°C | 室温に戻します。使用前にしっかりボルテックスします。 |
| TB1 | -25°C ~ -15°C | 室温に戻します。使用前にしっかりボルテックスします。 |

2. COV1 プレートと COV2 プレートが冷凍保存されていた場合は、次のとおり調製します。

- a. 室温で融解します。
- b. シールされていることを確認し、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
- c. 1,000 x g で 1 分間遠心します。

3. 以下の COVIDSeq TAG プログラムをサーマルサイクラーに保存します。

- 「リッドのプレヒート」オプションを選択します
- 反応量を 50 μ L に設定します
- 55°C で 5 分間
- 10°C で保持します

手順

1. 新しい PCR プレートに TAG1 とラベルします。
2. COV1 と COV2 を次のとおり混合します。
 - a. COV1 プレートの各ウェルから 10 μ L を、TAG1 プレートの対応するウェルに移します。
 - b. COV2 プレートの各ウェルから 10 μ L を、COV1 を移した TAG1 プレートの各ウェルに移します。
3. 15 mL チューブ内で、以下の分量を混合して Tagmentation Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプルの数を掛けます。
 - TB1 (12 μ L)
 - EBLTS (4 μ L)
 - ヌクレアーゼフリー水 (20 μ L)
4. TAG1 プレートの各ウェルに、Master Mix を 30 μ L 添加します。
5. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
6. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーにセットし、COVIDSeq TAG プログラムを実行します。

タグメンテーション後のクリーンアップ

このステップでは、PCR 増幅の前にアダプター付加したアンプリコンを洗浄します。

消耗品

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB (Tagmentation Wash Buffer)
- Microseal 'B' 粘着シール

試薬について

- ST2 と TWB をゆっくりと分注して泡立ちを最小限に抑えます。
- TWB をビーズ上に直接分注します。

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-----|-----------|----------------|
| ST2 | 室温 | 使用前にボルテックスします。 |
| TWB | 2°C ~ 8°C | 使用前にボルテックスします。 |

手順

1. TAG1 プレートを 500 x g で 1 分間遠心します。
2. TAG1 プレートの各ウェルに、ST2 を 10 μ L 添加します。
3. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
4. 室温で 5 分間インキュベートします。
5. 500 x g で 1 分間遠心します。
6. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 3 分間) 待ちます。
7. シールの上に気泡がないか確認します。気泡がある場合は、500 x g で 1 分間遠心し、磁気スタンドに載せます (~ 3 分間)。
8. 上清をすべて除去し、廃棄します。
9. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドから外します。
 - b. 各ウェルに TWB を 100 μ L 添加します。
 - c. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
 - d. 500 x g で 1 分間遠心します。
 - e. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 3 分間) 待ちます。
 - f. 初回洗浄の場合のみ、各ウェルからすべての上清を取り除き、廃棄します。
10. 2 回目のビーズ洗浄を行います。

ビーズが乾燥しすぎないように、2 回目の洗浄では上清をプレートに残しておきます。

タグメンテーションしたアンプリコンの増幅

このステップでは、PCR プログラムを使ってタグメンテーションされたアンプリコンを増幅します。PCR ステップでは、あらかじめ対になっている 10 bp の Index 1 (i7) アダプターと Index 2 (i5) アダプター、およびシーケンスクラスター形成に必要な配列を付加します。

消耗品

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- インデックスアダプター (IDT for Illumina-PCR Indexes Set 1, 2, 3, 4)
- ヌクレアーゼフリー水
- 15 mL チューブ (96 ウェルサンプルプレート 2 個当たり1本)
- 96 ウェル PCR プレート

試薬について

- インデックスアダプタープレート
 - サンプルをインデックスプレートのウェルに添加しないでください。
 - インデックスプレートウェルは使い切りとし、再利用はしないでください。

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-------------|---------------|---|
| EPM | -25°C ~ -15°C | 転倒混和します。使用時まで氷上保存します。 |
| インデックスアダプター | -25°C ~ -15°C | 室温で融解します。ボルテックスして混合し、1,000 × g で 1 分間遠心します。 |

2. 準備したそれぞれのインデックスアダプタープレートを次のとおり開封します。インデックスセットごとに新しい PCR プレートを使用方法に従って使用します。
 - a. インデックスアダプタープレートの上に新しい 96 ウェル PCR プレートを重ねて押し下げ、ホイルシールに穴を開けます。
 - b. PCR プレートを廃棄します。
3. 以下の COVIDSeq TAG PCR プログラムをサーマルサイクラーに保存します。
 - 「リッドのプレヒート」オプションを選択し、100°C に設定します
 - 反応量を 50 µL に設定します
 - 72°C で 3 分間
 - 98°C で 3 分間
 - 以下で 7 サイクル：
 - 98°C で 20 秒間

- 60°Cで 30 秒間
- 72°Cで 1 分間
- 72°Cで 3 分間
- 10°Cで保持します

手順

1. 15 mL チューブ内で、以下の分量を混合して PCR Master Mix を調製します。それぞれの分量にサンプルの数を掛けます。
 - EPM (24 μ L)
 - ヌクレアーゼフリー水 (24 μ L)
2. PCR Master Mix をボルテックスして混合します。
3. TAG1 プレート を磁気スタンドに載せたまま、TWB を除去します。
4. 20 μ L ピペットで残存した TWB を除去します。
5. TAG1 プレート を磁気スタンドから外します。
6. 各ウェルに PCR Master Mix を 40 μ L 添加します。
7. PCR プレートの各ウェルにインデックスアダプターを 10 μ L 添加します。
8. シールし、1600 rpm で 1 分間攪拌します。
9. シールに液体が見える場合は、500 x g で 1 分間遠心します。
10. ビーズが再懸濁されたことを確認します。再懸濁する場合は、プランジャーを下げた状態でピペットを 35 μ L に設定し、ゆっくりピペッティングして混合します。
11. 事前にプログラムしたサーマルサイクラーにセットし、COVIDSeq TAG PCR プログラムを実行します。

ライブラリーのプーリングとクリーンアップ

このステップでは、各 96 ウェルサンプルプレートのライブラリーを 1 本の 1.7 mL チューブにまとめます。その後、最適なサイズのライブラリーを磁気ビーズに結合し、長すぎるまたは短すぎる断片を除去します。

消耗品

- [Illumina COVIDSeq Test (RUO)] ITB (Illumina Tune Beads)
- [Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)] IPB (Illumina Purification Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 用時調製した80%エタノール (EtOH)
- 1.7 mLチューブ (96ウェルサンプルプレート当たり2本)
- [Illumina COVIDSeq Test (RUO)] PCR 8連チューブ

試薬について

- ITBまたはIPB
 - 使用前に毎回ボルテックスにかけてください。
 - ビーズが均一になるよう、頻繁にボルテックスしてください。
 - 溶液の粘性が高いため、吸引や分注はゆっくり行ってください。

準備

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-------------|-----------|------------------------------------|
| ITB または IPB | 室温 | しっかりボルテックスして混合します。 |
| RSB | 2°C ~ 8°C | 30 分間静置し、室温に戻します。ボルテックスおよび転倒混和します。 |

2. プール済みライブラリー 1 チューブ当たり、無水エタノールから用時調製した 80% エタノール 2.5 mL を準備します。

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) のための手順

以下に、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットのための手順を記載します。Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットの場合は、[15 ページの「Illumina COVIDSeq Test \(RUO\) のための手順」](#)を参照してください。

1. TAG1 プレートを 500 × g で 1 分間遠心します。
2. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 3 分間) 待ちます。
3. ライブラリーのプーリングを行うには、使用キットに対応する以下のステップを行います。追加のサンプルプレートごとに、これらのステップを繰り返します。
 - a. 新しい 1.7 mL チューブに Pooled IPB とラベルします。
 - b. TAG1 プレートの各ウェルから、ライブラリーを 5 µL、Pooled IPB チューブに移します。
4. Pooled IPB チューブをボルテックスして混合し、軽く遠心します。
5. IPB をボルテックスして懸濁します。
6. Pooled IPB Tube の溶液に対して 0.9 倍量の IPB を添加します。例えば、96 サンプルの場合には、各チューブに 432 µL の IPB を添加します。
7. ボルテックスして混合します。
8. 室温で 5 分間インキュベートします。
9. 軽く遠心します。
10. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 5 分間) 待ちます。
11. 上清をすべて除去し、廃棄します。

12. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各チューブに用時調製した 80% EtOH を 1000 μ L ずつ添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
13. 2 回目のビーズ洗浄を行います。
14. 20 μ L ピペットで残存した EtOH をすべて除去します。
15. RSB を 55 μ L 添加します。

注記

ライブラリーの収量は十分量あるため、サンプル数に関わらず RSB の量は一定で構いません。

16. ボルテックスして混合し、軽く遠心します。
17. 室温で 2 分間インキュベートします。
18. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 2 分間) 待ちます。
19. 各 Pooled IPB チューブから、上清を 50 μ L、新しいマイクロチューブに移します。

安全なストップポイント

中断する場合は、チューブにキャップをし、-25°C ~ -15°C で最長 30 日間保管できます。

Illumina COVIDSeq Test (RUO) のための手順

以下に、Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットのための手順を記載します。Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットの場合は、[14 ページの「Illumina COVIDSeq Assay \(96 Samples\) のための手順」](#)を参照してください。

1. TAG1 プレート を 500 \times g で 1 分間遠心します。
2. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで (~ 3 分間) 待ちます。
3. ライブラリーのプーリングを行うには、以下のように行います。追加のサンプルプレートごとに、これらのステップを繰り返します。
 - a. 20 μ L の 8 チャンネルピペットを用いて、TAG1 プレート各ウェルから、ライブラリーを 5 μ L、PCR 8 連チューブに移します。プールライブラリーが行当たり 60 μ L となります。列ごとにチップを交換します。
 - b. 新しい 1.7 mL チューブに Pooled ITB とラベルします。
 - c. PCR 8 連チューブの各ウェルから、プールライブラリーを 55 μ L、Pooled ITB チューブに移します。これらの分量は、サンプルプレート 1 個当たり、プールライブラリー 440 μ L となります。3,072 サンプルを処理している場合、これらのステップにより Pooled ITB チューブは 32 本になります。
4. Pooled ITB チューブをボルテックスして混合し、軽く遠心します。
5. ITB をボルテックスして懸濁します。
6. Pooled ITB Tube の溶液に対して 0.9 倍量の ITB を添加します。例えば、96 サンプルの場合には、各チューブに 396 μ L の ITB を添加します。
7. ボルテックスして混合します。

8. 室温で 5 分間インキュベートします。
9. 軽く遠心します。
10. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（～ 5 分間）待ちます。
11. 上清をすべて除去し、廃棄します。
12. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. 磁気スタンドに載せたまま、各チューブに用時調製した 80% EtOH を 1000 μ L ずつ添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. 上清をすべて除去し、廃棄します。
13. 2 回目のビーズ洗浄を行います。
14. 20 μ L ピペットで残存した EtOH をすべて除去します。
15. RSB を 55 μ L 添加します。

i | 注記

ライブラリーの収量は十分量あるため、サンプル数に関わらず RSB の量は一定で構いません。

16. ボルテックスして混合し、軽く遠心します。
17. 室温で 2 分間インキュベートします。
18. 磁気スタンドに載せ、液体が透明になるまで（～ 2 分間）待ちます。
19. 各 Pooled ITB チューブから、上清を 50 μ L、新しいマイクロチューブに移します。

安全なストップポイント

中断する場合は、チューブにキャップをし、-25°C～ -15°Cで保存します（最長 30 日間）。

ライブラリーの定量とノーマライゼーション

1. Qubit dsDNA HS Assay キットを用いて、ライブラリープール 2 μ L を分析します。

ライブラリーが標準範囲外の場合、1:10 の濃度で希釈し、再度分析します。

2. 以下の式を用いて、モル濃度を求めます。
 - 平均ライブラリーサイズを 400 bp とします。

$$\frac{\text{Library concentration ng}/\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{average library size (bp)}} \times 10^6 = \text{Molarity (nM)}$$

3. RSB を使用し、各ライブラリープールを最小ボリューム 30 μ L、ノーマライズ濃度 4 nM となるように希釈します。

ライブラリーのプーリングと希釈

開始濃度の 4 nM に希釈後、ライブラリーを変性させて最終ローディング濃度に希釈します。

- 適切なインデックスアダプターセットを含むノーマライズ済みライブラリーを所定量、表 1 に示すそれぞれのサンプル数分、新しいマイクロチューブに移します。

ノーマライズ済みプールが複数ある場合は、それぞれのノーマライズ済みプールの所定量をチューブ内で混合します。そうすることで、最終プールが開始濃度の 4 nM に希釈されます。同じインデックスアダプターセットのプールを混ぜ合わせないでください。

表 1 変性と希釈に必要な各装置のノーマライズ済みライブラリーの所定量とサンプル数

| システム | ラン当たりのノーマライズ済みライブラリー使用量 (µL) | ノーマライズ済みライブラリーの最終プール当たりのサンプル数 | フローセル当たりのサンプル数 |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| iSeq 100 v1/v2 フローセル | 2 | 8 | 8 |
| MiSeq v2 フローセル | 5 | 30 | 30 |
| MiSeq v3 フローセル | 5 | 48 | 48 |
| MiniSeq HO フローセル | 25 | 48 | 48 |
| NextSeq 500/550/550Dx HO フローセル | 25 | 384 | 384 |
| NovaSeq 6000 SP フローセル | 25 | 384 | レーン当たり384、フローセル当たり768 |
| NovaSeq 6000 S4 フローセル | 25 | 384 | レーン当たり384、フローセル当たり1,536 |
| NextSeq 1000/2000 P2 フローセル | 25 | 384 | 384 |

- 使用するシステムの変性希釈手順に従って、最終ローディング濃度に希釈します。
 - iSeq システムの場合は、『iSeq 100 Sequencing System Guide』（文書番号：1000000036024）を参照。
 - MiSeq システムの場合は、『MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：15039740）を参照。
 - MiniSeq システムの場合は、『MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000002697）を参照。
 - NextSeq 500/550 システムおよび NextSeq 550Dx システムの場合は、『NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：15048776）を参照。
 - NovaSeq 6000 システムの場合は、『NovaSeq 6000 Denature and Dilute Libraries

Guide』（文書番号：1000000106351）を参照。

- NextSeq 2000 システムの場合は、『NextSeq 1000/2000 Sequencing System Guide』（文書番号：1000000109376）を参照。

3. 使用するシステムに応じて、以下のローディング濃度を用います。

表 2 各装置のローディング濃度

| システム | 開始濃度 (nM) | 最終ローディング濃度 (pM) |
|--------------------------------|-----------|-----------------|
| iSeq 100 v1/v2 フローセル | 4 | 75 |
| MiSeq v2 フローセル | 4 | 10 |
| MiSeq v3 フローセル | 4 | 12 |
| MiniSeq HO フローセル | 4 | 1.2 |
| NextSeq 500/550/550Dx HO フローセル | 4 | 1.4 |
| NovaSeq 6000 SP フローセル | 4 | 100 |
| NovaSeq 6000 S4 フローセル | 4 | 100 |
| NextSeq 1000/2000 P2 フローセル | 4 | 1000 |

最終ローディング濃度への調整は、使用するシステムの変性と希釈の手順に従って行います。

シーケンスの準備

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) は、iSeq 100 i1 試薬 v2、MiSeq 試薬キット v2 および v3、MiniSeq High Output (HO) 試薬キットに対応しています。

Illumina COVIDSeq Test (RUO) は、NovaSeq 6000 システム SP および S4 フローセル、NextSeq 2000 システム、NextSeq 500/550 システム、NextSeq 550Dx システムの各装置に対応しています。

シーケンス用のリードに関する推奨事項

リード長とリード深度は、サンプルの種類とワークフローでの必要性に応じて最適化できます。抽出した RNA のウイルス力価と品質が、コンセンサスゲノムの最適なコールを達成するために必要なリード構成に影響を及ぼすことがあります。リード深度を大きくすると、カバレッジが改善する場合があります。

すべてのランについて、推奨リード長は 2 × 150 です。リード長を 2 × 75 に短くしたリードを使用することもできます。

低複雑性かつ高力価のサンプル（鼻咽頭スワブなど）の場合、推奨最小リード深度は 0.5M 断片（合計 1M リード）です。

高複雑性かつ低力価のサンプル（廃水など）の場合、推奨最小リード深度は 4M 断片（合計 8M リード）です。

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) のシーケンスランのセットアップ

ランのセットアップについては、各使用システムの文書および以下の情報を参照してください。

- iSeq システムを使用する場合は、『iSeq System Guide』（文書番号：1000000036024）を参照してください。
- MiSeq システムを使用する場合は、『MiSeq System Guide』（Windows 10 用の文書番号：15027617、Windows 7 用の文書番号：1000000154717）を参照してください。
- MiniSeq システムを使用する場合は、『MiniSeq System Guide』（文書番号：1000000002695）を参照してください。
- Local Run Manager を使用する場合は、『Local Run Manager Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。
- BaseSpace Sequence Hub アプリを使用する場合は、使用する装置の必要に応じてモニタリングとストレージを有効にしてください。
 - iSeq システムの場合は、システムの設定で、「**Run Analysis, Collaboration, and Storage**」を選択するか有効にしてください。
 - MiniSeq システムの場合は、「Configuration」オプションで「**Run Monitoring and Storage**」を選択してください。
- 「Read Type」に「**Paired End**」と入力します。
- Index 1 と Index 2 の値を「**10**」と入力します。

Illumina COVIDSeq Test (RUO) のシーケンスランのセットアップ

ランのセットアップについては、各使用システムの文書および以下の情報を参照してください。

- NextSeq 500/550システムまたはNexSeq 550Dx システムを使用する場合は、『NextSeq 500 System Guide』（文書番号：15046563）、『NextSeq 550 System Guide』（文書番号：15069765）、『NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide』（文書番号：1000000009513）のいずれかを参照してください。
- NovaSeq 6000 システムを使用する場合は、シーケンスに関する手順として『NovaSeq 6000 Sequencing System Guide』（文書番号：1000000019358）を参照してください。
- NextSeq 2000 を使用する場合は、『NextSeq 1000/2000 Sequencing System Guide』（文書番号：1000000109376）を参照してください。
- Local Run Managerを使用する場合は、『Local Run Manager Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。
- 「Read Type」に「**Paired End**」と入力します。
- Index 1 と Index 2 の値を「**10**」と入力します。

解析ソフトウェア

シーケンスが完了すると、インストールされているパイプラインソフトウェアを使用して解析がローカルにて開始されるか、BaseSpace Sequence Hub にて開始されます。

消耗品および機器

本文書で説明したプロトコールは、ユーザーがこのセクションの内容をレビューし、プロトコールの内容を確認して、必要な消耗品および機器をすべて揃えていることを前提としています。

Illumina COVIDSeq Assay Kit (96 Samples) の内容

ロースルーブットシーケンス用の Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) には 4 種類のキットオプションがあります。キットオプションごとに、異なる IDT for Illumina-PCR Indexes のセットが含まれています。

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) には、オプションの COVIDSeq Positive Control は含まれておらず、別途購入する必要があります。[22 ページの「COVIDSeq Positive Control \(オプション\)」](#)を参照してください。

表 3 Illumina COVIDSeq Assay Kit Options (96 Samples)

| キット | カタログ番号 |
|---|----------|
| Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)、Index Set 1 あり | 20049393 |
| Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)、Index Set 2 あり | 20051772 |
| Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)、Index Set 3 あり | 20051773 |
| Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)、Index Set 4 あり | 20051774 |

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)

正常に機能するよう、納品後は直ちに指定温度で保管してください。

表 4 Illumina COVIDSeq Assay Box 1 – 96 Samples、製品番号20051272

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|-----|-----------------------------|---------------|
| 1 | 15 | IPB | Illumina Purification Beads | 室温、ポスト PCR 環境 |
| 1 | 2 | ST2 | Stop Tagment Buffer 2 | 室温、ポスト PCR 環境 |

表 5 Illumina COVIDSeq Assay Box 2 – 96 Samples、製品番号 20051273

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|-------|--------------------------|-------------------------|
| 2 | 2 | EBLTS | Enrichment BLT | 2°C～8°C、ポスト PCR 環境 |
| 3 | 2 | ELB | Elution Buffer | 2°C～8°C、プレ PCR 環境 |
| 2 | 2 | RSB | Resuspension Buffer | -25°C～15°C、ポスト PCR 環境 * |
| 1 | 50 | TWB | Tagmentation Wash Buffer | 15°C～30°C、ポスト PCR 環境 * |

*保管温度 2°C～8°Cも許容範囲です。

表 6 Illumina COVIDSeq Assay Box 3 – 96 Samples、製品番号 20051274

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|------|--------------------------------|------------------------|
| 1 | 2 | C5P1 | COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 1 | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 2 | C5P2 | COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 2 | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 4 | 0.5 | EPH3 | Elution Prime Fragment 3HC Mix | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 3 | 2 | EPM | Enhanced PCR Mix | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 3 | 0.5 | FSM | First Strand Mix | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 4 | 2 | IPM | Illumina PCR Mix | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 2 | 0.5 | RVT | Reverse Transcriptase | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 6 | 0.5 | TB1 | Tagmentation Buffer 1 | -25°C～-15°C、ポスト PCR 環境 |

表 7 Illumina COVIDSeq Assay Box 4 – 96 Samples, Indexes

| 数量 | 詳細 | 保管 |
|----|---|---------------|
| 1 | 以下のセットのいずれか 1 個 : <ul style="list-style-type: none"> • IDT for Illumina- PCR Indexes Set 1 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes Set 2 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes Set 3 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes Set 4 (96 Indexes) | -25°C ~ -15°C |

COVIDSeq Positive Control (オプション)

COVIDSeq Positive Control (CPC) はオプションです。Illumina COVIDSeq Assay および Illumina COVIDSeq Test とは別売りです。

表 8 Illumina COVIDSeq Positive Control、カタログ番号 : 20051775

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|-----|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 100 µL | CPC | COVIDSeq Positive Control | -85°C ~ -65°C、プレ PCR 環境 |

Illumina COVIDSeq Test (RUO) Kit (3072 Samples) の内容

ハイスループットシーケンス用の Illumina COVIDSeq Test (RUO) には、Illumina COVIDSeq Test (3072 Samples) と、IDT for Illumina-PCR Indexes Set 1 ~ 4 各 8 キットが必要です。

| コンポーネント | キット | カタログ番号 |
|----------|---|----------|
| ライブラリー調製 | Illumina COVIDSeq Test (3072 Samples) | 20043675 |
| インデックス | IDT for Illumina-PCR Indexes Sets 1-4 (384 Indexes) | 20043137 |

Illumina COVIDSeq Test (RUO)

正常に機能するよう、納品後は直ちに指定温度で保管してください。

表 9 Illumina COVIDSeq Test Box 1 – 3072 Samples、製品番号 20044405

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|--------|--------------------------|---------------|
| 1 | 233 | ITB | Illumina Tune Beads | 室温 |
| 1 | 56 | ST2 HT | Stop Tagment Buffer 2 HT | 室温、ポスト PCR 環境 |

表 10 Illumina COVIDSeqTest Box 2 – 3072 Samples、製品番号 20044406

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|----------|-----------------------------|--------------------|
| 2 | 6.1 | EBLTS HT | Enrichment BLT HT | 2°C～8°C、ポスト PCR 環境 |
| 1 | 114 | ELB HT | Elution Buffer HT | 2°C～8°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 10 | RSB HT | Resuspension Buffer HT | 2°C～8°C、ポスト PCR 環境 |
| 1 | 845 | TWB HT | Tagmentation Wash Buffer HT | 2°C～8°C、ポスト PCR 環境 |

表 11 Illumina COVIDSeq Test Box 3 – 3072 Samples、製品番号 20044407

| 数量 | ラベルに記載の分量 (mL) | 試薬 | 詳細 | 保管 |
|----|----------------|---------|-----------------------------------|------------------------|
| 1 | 14.4 | C5P1 HT | COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 1 HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 14.4 | C5P2 HT | COVIDSeq v5.4.2 Primer Pool 2 HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 45 | EPH3 HT | Elution Prime Fragment 3HC Mix HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 79 | EPM HT | Enhanced PCR Mix HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 41 | FSM HT | First Strand Mix HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 100 | IPM HT | Illumina PCR Mix HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 4.6 | RVT HT | Reverse Transcriptase HT | -25°C～-15°C、プレ PCR 環境 |
| 1 | 38 | TB1 HT | Tagmentation Buffer 1 HT | -25°C～-15°C、ポスト PCR 環境 |

IDT for Illumina- PCR Indexes (-25°C～ -15°Cで保管)

Illumina COVIDSeq Test (RUO) には、IDT for Illumina-PCR Indexes Set 1～4 各 8 キット（合計 32 個の 96 ウェルプレート）が必要です。

| 数量 | 詳細 | 製品番号 |
|----|--|----------|
| 8 | IDT for Illumina- PCR Indexes Set 1 (96 Indexes) | 20043132 |
| 8 | IDT for Illumina- PCR Indexes Set 2 (96 Indexes) | 20043133 |
| 8 | IDT for Illumina- PCR Indexes Set 3 (96 Indexes) | 20043134 |
| 8 | IDT for Illumina- PCR Indexes Set 4 (96 Indexes) | 20043135 |

消耗品および機器

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) 本プロトコールを開始する前に、使用キット (Illumina COVIDSeq Test (RUO) または Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)) および IDT for Illumina-PCR Indexes に加えて、必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。

消耗品

| 消耗品 | サプライヤー |
|--|-------------------------------------|
| 10 µL ピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 20 µL ピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 µL ピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 1000 µL ピペットチップ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 以下の仕様の Hard-Shell 96 ウェル PCR プレート： <ul style="list-style-type: none"> 1 ウェル最大容量が 0.2 mL ある 96 ウェル。 ポリプロピレンまたはこれに相当するもの。 使用するサーマルサイクラーとの互換性がある。 | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 96 ディープウェルプレート、2000 µL | Eppendorf 社、カタログ番号：951033707 |
| 8 連チューブ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 1.7 mL LoBind マイクロチューブ | Eppendorf 社、カタログ番号：022431021 |
| 5 mL LoBind マイクロチューブ | Eppendorf 社、カタログ番号：0030122348 |
| 15 mL チューブ | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| ラボ用ティッシュ、リントフリー | VWR 社、カタログ番号：21905-026 またはこれに相当するもの |
| リントフリーアルコールワイプ | 一般的なラボ用品サプライヤー |

| 消耗品 | サプライヤー |
|---|---|
| Microseal 'B' 粘着シール | Bio-Rad 社、製品番号 MSB-1001 |
| RNase/DNase-free Disposable Pipetting Reservoirs | VWR 社、製品番号 89094-658 |
| 使用する抽出法に応じて、以下のうちのいずれか 1 つ： <ul style="list-style-type: none"> • QIAamp Viral RNA Mini Kit • Quick DNA/RNA Viral MagBead 注文数量はキットのサイズに応じて異なります。 | <ul style="list-style-type: none"> • Qiagen 社、カタログ番号：52906 • Zymo Research 社、カタログ番号：R2141 |
| Qubit dsDNA HS Assay Kit | キットのサイズに応じて、以下のうちのいずれか 1 つ： <ul style="list-style-type: none"> • ThermoFisher Scientific 社、製品番号 Q32851 • ThermoFisher Scientific 社、製品番号 Q32854 |
| Qubit Assay Tubes | ThermoFisher Scientific 社、カタログ番号：Q32856 |
| iSeq 100 システムを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 Cycles) | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号：20031371 |
| MiSeq システム v2 試薬キットを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号 MS-102-2002 |
| MiSeq システム v3 試薬キットを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号 MS-102-3003 |
| MiniSeq システムを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • MiniSeq High Output Reagent Kit (300 Cycles) | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号 FC-420-1003 |
| NovaSeq 6000 システム S4 フローセルを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq 6000 システム S4 Reagent Kit v1.5 (35 cycles) × 2 • NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 × 2 | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号：20044417 • イルミナ、カタログ番号：20043131 |
| NovaSeq 6000 システム SP フローセルを使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq 6000 システム SP Reagent Kit v1.5 (100 サイクル) × 4 • NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 × 4 | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号：20028401 • イルミナ、カタログ番号：20043130 |
| NextSeq 500/550 システムまたは NextSeq 550Dx システムの装置を使用する場合： <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) × 8 | <ul style="list-style-type: none"> • イルミナ、カタログ番号：20024906 |

| 消耗品 | サプライヤー |
|--|--|
| NextSeq 2000 システムを使用する場合： | |
| <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (100 cycles) × 8 | <ul style="list-style-type: none"> イルミナ、カタログ番号：20046811 |

必要な機器（提供なし）

| 機器 | サプライヤー |
|--|--|
| 10 µL シングルチャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 20 µL シングルチャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 µL シングルチャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 1000 µL シングルチャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 10 µL 8 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 20 µL 8 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 µL 8 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 1000 µL 8 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 20 µL 12 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 200 µL 12 チャンネルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 10 mL セロロジカルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 25 mL セロロジカルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 50 mL セロロジカルピペット | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| BioShake iQ | QInstruments 社、製品番号 1808-0506 |
| 以下のうち、いずれか 1 つの抽出法に必要な機器： | |
| <ul style="list-style-type: none"> Quick-DNA/RNA Viral MagBead の機器 QIAamp Viral RNA Mini Kit の機器 | <ul style="list-style-type: none"> 『Quick-DNA/RNA Viral MagBead Instruction Manual』（Zymo Research 社）参照 『QIAamp Viral RNA Mini Handbook』（文書番号：HB-0354-006、Qiagen 社）参照 |
| 冷凍庫、-25°C～ -15°C | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 冷凍庫、-85°C～-65°C（オプションの陽性コントロールを使用する場合） | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| Magnetic Stand-96 | Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号：AM10027 |

| 機器 | サプライヤー |
|---|---|
| 以下のうち、いずれか 1 つの磁気スタンド： | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Dynabeads MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) • MagnaRack Magnetic Separation Rack | <ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号：A13346 • Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号：CS15000 |
| 微量遠心機 | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| マイクロプレート遠心機 | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 以下のうち、いずれか 1 つのシーケンスシステム： | イルミナ |
| <ul style="list-style-type: none"> • iSeq 100 システム • MiSeq システム • MiniSeq システム • NextSeq 500 システム • NextSeq 550 システム • NextSeq 550Dx システム • NextSeq 2000 システム • NovaSeq 6000 システム | |
| NovaSeq Xp Flow Cell Dock | イルミナ、番号 20021663 |
| 電動ピペッター | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| Qubit Fluorometer 3.0 | Thermo Fisher 社、カタログ番号：Q33216、Q33217、Q33218のいずれか |
| 冷蔵庫、2°C～8°C | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| 以下の仕様のサーマルサイクラー： | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| <ul style="list-style-type: none"> • ヒートリッド • 最低温度制御範囲：4°C～99°C • フォーマット：0.2 mLチューブ、96ウェルプレート • 温度精度：±0.25°C (35°C～99.9°C) • 温度均一性：目標温度に到達後30秒以内で、ウェル間で±0.5°C • 最高ランプ速度：1.5°C以上 • サンプルのランプ速度：±1.25°C | |
| シーリングウェッジまたはローラー | 一般的なラボ用品サプライヤー |
| ボルテックス | 一般的なラボ用品サプライヤー |

COVIDSeq Positive Control の調製

COVIDSeq Positive Control の調製 28

COVIDSeq Positive Control の調製

本手順では、COVIDSeq Positive Control (CPC) を希釈し、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) や Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットと使用できるように調製します。

消耗品

- 1.7 mL LoBind チューブ
- 5 mL LoBind チューブ
- COVIDSeq Positive Control

試薬について

- CPCの凍結融解を複数回繰り返さないでください。ライブラリー調製を複数回行う場合は、CPCを低吸着チューブに分注し、-85°C~-65°Cで保管してください。
- 使用前に毎回ボルテックスにかけてください。

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) のための調製

以下に、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットのための手順を記載します。Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットの場合は、[29 ページの「Illumina COVIDSeq Test \(RUO\) のための調製」](#)を参照してください。

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) では COVIDSeq Positive Control (CPC) の使用が推奨されますが、必須ではありません。

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|-----|---------------|-----------------------------------|
| ELB | 2°C ~ 8°C | 室温で融解し、転倒混和します。使用時まで氷上保存します。 |
| CPC | -85°C ~ -65°C | 以下のとおり希釈します。希釈後の陽性コントロールは氷上保存します。 |

2. CPC を次のとおり希釈します。
 - a. 1.7 mL チューブに Dilution 1 とラベルします。
 - b. チューブに以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - CPC (1 µL)
 - ELB (99 µL)
 これらの分量で、1 µL 当たり10,000 コピーとなります。
 - c. パルスボルテックスして混合します。

3. 2 回目の CPC 希釈を次のとおり行います。
 - a. 1.7 mL チューブに Dilution 2 とラベルします。
 - b. チューブに以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - Dilution 1 (1 μ L)
 - ELB (99 μ L)
 これらの分量で、1 μ L 当たり100 コピーとなります。
 - c. パルスボルテックスして混合します。

Illumina COVIDSeq Test (RUO) のための調製

以下に、Illumina COVIDSeq Test (RUO) キットののための調製手順を記載します。Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットの場合は、[28 ページの「Illumina COVIDSeq Assay \(96 Samples\) のための調製」](#)を参照してください。

Illumina COVIDSeq Test (RUO) では COVIDSeq Positive Control (CPC) の使用が推奨されますが、必須ではありません。

1. 次の消耗品を準備します。

| 試薬 | 保管 | 手順 |
|--------|---------------|-----------------------------------|
| ELB HT | 2°C ~ 8°C | 室温で融解し、転倒混和します。使用時まで氷上保存します。 |
| CPC | -85°C ~ -65°C | 以下のとおり希釈します。希釈後の陽性コントロールは氷上保存します。 |

2. CPC を次のとおり希釈します。
 - a. 1.7 mL チューブに Dilution 1 とラベルします。
 - b. チューブに以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - CPC (5 μ L)
 - ELB HT (495 μ L)
 これらの分量で、1 μ L 当たり10,000 コピーとなります。
 - c. パルスボルテックスして混合します。
3. 2 回目の CPC 希釈を次のとおり行います。
 - a. 1.7 mL チューブに Dilution 2 とラベルします。
 - b. チューブに以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - Dilution 1 (5 μ L)
 - ELB HT (495 μ L)
 これらの分量で、1 μ L 当たり100 コピーとなります。
 - c. パルスボルテックスして混合します。

4. 3 回目の CPC 希釈を次のとおり行います。
 - a. 5 mL チューブに Dilution 3 とラベルします。
 - b. チューブに以下の分量を以下の記載順に添加します。
 - Dilution 2 (200 μ L)
 - ELB HT (3.8 mL)これらの分量で、1 μ L 当たり5 コピーとなります。
 - c. パルスボルテックスして混合します。

改訂履歴

| 文書 | 日付 | 変更内容 |
|----------------------------|----------------|---|
| 文書番号： 1000000126053 v09 | 2024 年 11 月 | <ul style="list-style-type: none"> プライマーのチューブをv3からv5.4.2に更新。 オプションのv4プライマーセットの説明を削除。 HTキットから陽性コントロールを削除（別途入手可能）。 |
| 文書番号： 1000000126053 v08 | 2022 年 2 月 | <ul style="list-style-type: none"> 『QIAmp Viral RNA Mini Handbook』の文書番号を修正。 Illumina COVIDSeq Assay Box 2 – 96 Samples、RSB、TWB の保管温度を更新。 |
| 文書番号： 1000000126053 v07 | 2021 年 10 月 | <ul style="list-style-type: none"> オプションの ARTIC v4 プライマーに関する情報を、「概要」および「Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットの内容」に追加。 「シーケンスの準備」のセクションにリード長に関する推奨事項について、新しいテクニカルノートへの参照を追加。 2 種類のキットについて、別々のサブセクションに記載するため、「プーリングとクリーンアップ」のセクションを再編成。 Illumina COVIDSeq RUO Kit 間での試薬の違いを説明するため、「Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) キットの内容」およびプロトコルの「はじめに」の注記を更新。 ノーマライズしたプーリング用量と v4 プライマーに対する推奨サンプルについて新しい表を作成するため、「ライブラリーのプーリングと希釈」のセクションを更新。 選択したサーマルサイクラーとの互換性の確認のため、指定されたプレートまたはこれに相当するものを、仕様を含む仕様リストに変更し、消耗品リストの96 ウェル PCR プレートを更新。 「シーケンスの準備」のセクションの『MiSeq System Guide』の文書番号を修正。 希釈は 2 回のみ必要なことを明確にするため、Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) における COVIDSeq Positive Control の希釈に関するステップを修正。 |
| 文書番号： 1000000126053 v06 | 2021 年 7 月 | <ul style="list-style-type: none"> iSeq 100 システムとの互換性に関する情報を該当箇所（「はじめに」、「ライブラリーのプーリングと希釈」、「シーケンスの準備」のセクション）に追加。 Illumina COVIDSeq Test (RUO)のサンプルシートに関する情報を付録に移動。 Illumina COVIDSeq Assay の命名規則とキットの構成を更新し、現在市場で使用されているものを反映。 「シーケンスの準備」のセクションを再編成し、使いやすさを改善。 シーケンス用消耗品に関する冗長な情報を「シーケンスの準備」のセクションから削除。この情報は付録中の「消耗品および機器」一覧に残されている。 |

| | | |
|------------------------------------|---------------------|--|
| <p>文書番号： 1000000126053 v05</p> | <p>2021年 6月</p> | <ul style="list-style-type: none"> 96 サンプル用の Illumina COVIDSeq Assay で使用することを説明するため、ガイド名を『Illumina COVIDSeq RUO Kits Reference Guide』に変更。 96 サンプル用 Illumina COVIDSeq Assay に関する情報を、「はじめに」、「DNAの抽出」、「ライブラリーのプーリングとクリーンアップ」、「ライブラリーのプーリングと希釈」、「シーケンスの準備」のセクションに追加。 MiSeq システムおよび MiniSeq システムとの互換性に関する情報を、「はじめに」、「ライブラリーのプーリングと希釈」、「シーケンスの準備」のセクションに追加。 「キットの内容」という新たなセクションを 96 サンプル用 Illumina COVIDSeq Assay の付録 A に追加。 COVIDSeq Positive Control (CPC) の調製に関する手順を新たに付録 B に移動し、Illumina COVIDSeq Assay に適合するように更新。 |
| <p>文書番号： 1000000126053 v04</p> | <p>2021年 4月</p> | <ul style="list-style-type: none"> バリエーション解析ソフトウェアのオプションに関する情報を「はじめに」と「シーケンスの準備」のセクションに追加。 バッチサイズがロースルーの場合にはライブラリー調製を複数回行うというテクニカルノートに参考文献を追加。 Illumina COVIDSeq Test (3072 samples) を「キットの内容」セクションで8 箱構成から 4 箱構成に更新。 「シーケンスの準備」のセクションのリード長に関する推奨事項を更新。 マイクロタイタープレートの互換性確認のための、サーマルサイクラーに関する推奨事項を更新。 |
| <p>文書番号： 1000000126053 v03</p> | <p>2021年 2月</p> | <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 2000 システムのための BaseSpace Sequence Hub での解析セットアップに関する手順およびその他の NextSeq 2000 システム固有の情報をプロトコール全体に追加。 サーマルサイクラーに関する推奨事項を追加。 「シーケンスの準備」、「製品の構成要素」、「消耗品および機器」のセクションで、材料・消耗品・機器の製品番号 (NextSeq 2000 システムの新たな消耗品を含む) を更新。 NovaSeq 6000 システムのフローセルおよびコントロールソフトウェアのバージョン番号を更新。 RNA 抽出における Dilution 3 のチューブを 5 mL LoBind チューブに更新。 「Quick-DNA/RNA Viral MagBead の手順」のプロトコールのオプションを更新し、精度と明確さを改善。 Amplify cDNA Preparation 用サーマルサイクラーの PCR プログラム中の温度を 65°C から 63°C に更新。 |

| | | |
|----------------------------|---------------|--|
| 文書番号： 1000000126053 v02 | 2020 年 7 月 | <ul style="list-style-type: none">• Quick-DNA/RNA Viral Magbead キットを用いて RNA 抽出する場合の手順を追加。• ライブラリーのプーリングとクリーンアップの後に安全なストップポイントを追加。• インデックスキットの構成を IDT for Illumina-PCR indexes に更新。• シーケンシングの手順を削除。• NovaSeq 6000 システム SP フローセル、NextSeq 500 システム、NextSeq 550 システム、NextSeq 550Dx Instrument での希釈とシーケンスの準備に関する手順を追加。• データ解析に関する情報を『Illumina COVIDSeq Test Pipeline Software Guide』（文書番号：1000000128122）に移動。 |
| 文書番号： 1000000126053 v01 | 2020 年 6 月 | 内容変更なし。 |
| 文書番号： 1000000126053 v00 | 2020 年 6 月 | 初版。 |

テクニカルサポート

技術的なサポートについては、イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。

ウェブサイト：jp.illumina.com

電子メール：techsupport@illumina.com

安全データシート(SDS):イルミナのウェブサイト jp.support.illumina.com/sds.html から入手できます。

製品関連文書：jp.support.illumina.com からダウンロードできます。



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。
© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®