

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 1 of 20
---	--	---

1. 原理

1.1 全体

分離培養された *Mycobacterium tuberculosis* 株からゲノムDNAを調製する。QIAseq FX DNA Library Kit(QIAGEN)を用い、ゲノムDNAからライブラリーを調製する。得られたライブラリーをイルミナシーケンサーにて解読し、*M. tuberculosis* 株のゲノムDNA配列を取得する。

1.2 ゲノムDNAの調製

患者より分離培養された *M. tuberculosis* 株を固形培地で増菌する。クロロホルム存在下でガラスビーズと菌体を激しく攪拌する事により、*M. tuberculosis* のもつ脂質に富んだ厚い細胞壁を効率的に溶解・破碎し、ゲノムDNAを抽出する。RNase A処理、フェノール・クロロホルム処理によりRNA、タンパク質、脂質、糖類等の不純物を除去し、イソプロピルアルコール沈殿によりゲノムDNAを回収し、バッファーに溶解する。

※市販のゲノムDNA調製カラムキットなどを用いることもできる。この場合、結核菌の不活化を確実に実施すること。

1.3 ライブラリーの調製

QIAseq FX DNA Library Kitを用い、抽出したゲノムDNAから、iSeq、MiniSeq、MiSeq、NextSeqなどのイルミナシーケンサーで解析可能な分子構造を持つDNA断片(ライブラリー)を調製する。キットに含まれるアダプターを用い、最大96株のゲノムDNAを株ごとに異なるDNA配列(インデックス)で標識したライブラリーを同時に調製する。シーケンスの品質を高めるため、アガロースゲル抽出により、適切なサイズのライブラリーを精製する。

1.4 ライブラリーの定量、変性、希釈

同時にシーケンスするライブラリーを混合する。Qubit (Thermo Fisher Scientific)を用い、混合したライブラリーの二本鎖DNA濃度を定量する。ライブラリーの濃度と平均サイズ(bp)からライブラリーのモル濃度を決定する。シーケンサー・プラットフォームに応じて、NaOH処理による一本鎖DNAへの変性及び推奨ローディング濃度へ希釈する。良好なシーケンス結果を得るため、モル濃度の計算と希釈は正確に実施する。

1.5 イルミナシーケンサーのラン

調製済みライブラリーをイルミナシーケンサーに投入する。150 bpペアエンド等の条件でランを実施し、ライブラリーをシーケンスする。

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 2 of 20
---	--	--

2. 略語

PCIAA	TE 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)
IPA	イソプロピルアルコール
1× TE	10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (10×TE を希釈)
EB	Elution Buffer (QIAGEN, 10 mM Tris-Cl, pH 8.5)
RNase A	リボヌクレアーゼ A
PCR	Polymerase Chain Reaction
1× TAE	40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (50× TAE を希釈)
RSB	Resuspension Buffer (illumina)
HT1	HT1 Hybridization Buffer (illumina)

3. 機材

- ・ 恒温器 (インキュベーター) : *M. tuberculosis* 培養用
- ・ VORTEX-GENIE2 (Electro Scientific Industries)
- ・ TurboMix™ (Electro Scientific Industries) : VORTEX-GENIE2 マイクロチューブ用アタッチメント
- ・ 小型遠心機 : 各種
- ・ 小型インキュベーター : MULTI-SHAKER OVEN HB (TAITEC) 等、37°C , 65°C の設定が可能なもの
- ・ 微量分光光度計 (Nano Drop One [Thermo Fisher Scientific] 等)
- ・ Qubit® 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) あるいは同等品
- ・ 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- ・ AMPure XP 精製用磁石スタンド (Fast Gene Magna Stand 等)
- ・ サーマルサイクラー (ヒートリッドの温度制御 [切、67°C、105°C] が可能なもの)
- ・ 電気泳動装置 : Mupid®-exU (株式会社 ミューピッド) あるいは同等品
- ・ 振とう機 : アガロースゲルの染色に使用可能なもの
- ・ 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
- ・ イルミナシーケンサー : iSeq、MiniSeq、MiSeq のいずれか (illumina)

4. 試薬類および消耗品

4.1 ゲノム DNA の調製

- ・ Middlebrook 7H10 寒天培地 あるいは 2% 小川培地
- ・ RNase A 溶液 (0.65 µg/µL) (100 mg/mL を滅菌水にて希釈)
- ・ PCIAA (4°C で 1~2 ヶ月、-20°C で 数年保管可能)
※ 明るいレモン色が、赤みを帯びた暗い赤色っぽいオレンジ色に変色した場合は、酸化が進んでいるので使用を避ける
- ・ クロロホルム
- ・ IPA

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 3 of 20
---	--	--

- ・ 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)
- ・ 75%エタノール
- ・ 滅菌水
- ・ EB (QIAGEN)
- ・ Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kits (Thermo Fisher Scientific)
あるいは同等品
- ・ Qubit assay tube (Thermo Fisher Scientific)
- ・ ビーズチューブ
 - ガラスビーズ 0.2 φ0.177~0.250 mm (アズワン) (乾熱滅菌済) : 600 mg
 - 0.1M NaCl/ 1× TE Buffer (滅菌済み) : 700 μL
 - クロロホルム : 500 μL
 - 上記を 2.0 mL スクリューキャップチューブに加える
 - ※0.1 M NaCl/ 1× TE Buffer とガラスビーズを加えたチューブを 4°Cで保存可能
 - 使用当日にクロロホルムをチューブに加える
- ・ 使い捨て白金耳 (10 μL)
- ・ Phase Lock Tube
 - 自作品 : 10~15 mL 遠心チューブ (V底,スクリューキャップ付き) に高真空シリコングリース (東レ Dow Corning, HVG-50 TUBE 50 g) を 3 g 封入後、軽く遠心する
 - 市販品 : MaXtract High Density (100 × 15 mL) (QIAGEN)
- ・ マイクロチューブ : 1.5 mL 平底

4.2 ライブラリーの調製

- ・ QIAseq FX DNA Library UDI Kit (24, 96 [Set-A, B, C, D], QIAGEN)
- ・ AMPure XP beads (BECKMAN COULTER)
- ・ 80%エタノール (用時調製)
- ・ 滅菌水
- ・ EB (QIAGEN)
- ・ アガロースゲル電気泳動用ローディング・ダイ (6× Loading Buffer Orange G [ニッポン・ジーン]等 Orange G 色素のものを推奨)
- ・ 1x TAE Buffer : 50xTAE を希釈
- ・ 2% (w/v) アガロースゲル : Agarose L03 (TAKARA) / 1× TAE Buffer
Mupid-exU用ゲルトレイ小 (6 cm × 11 cm) にアガロースを満載して作製、13ウェルのコームを使用すると、厚さ約1cmのゲルが出来る
- ・ サイズマーカー : GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
※製品取扱説明書に従って、調製する
- ・ ゲル染色液 : Green View Nucleic Acid Gel Stain (1× TAE Buffer で 10,000 倍希釈)
※調製後、密閉容器にて遮光・冷蔵庫保管で、約 1 か月間、5~6 回使用可能。目視で

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 4 of 20
---	--	---

明らかな退色が見られる場合は作り直す。

- Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega)
- 保冷用クラッシュアイス
- 8 連チューブあるいは 96 ウェルプレート
- マイクロチューブ：1.5 mL ~ 5.0 mL
- PCR プレート用アルミシール ※96 ウェルプレートを使用する場合
- DNA 低吸着チューブ：0.5 mL、1.5 mL、2.0 mL (例：DNA LoBind Tubes, eppendorf)
- ゲル切り出し用カッター (例：オルファ カッター替刃 (大) LB10KS 等)
- キャップレスチューブ：2.0 mL (2.0 mL チューブのフタを切ったもので良い)

4.3 ライブラリーの定量

- Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kits (Thermo Fisher Scientific)
あるいは同等品
- Qubit assay tube (Thermo Fisher Scientific)
- 保冷用クラッシュアイス

4.4 ライブラリーの変性、希釈

- PhiX Control v3 (illumina)
各シーケンサーの『Denature and Dilute Libraries Guide』や『System Guide』
に従い、予め変性・希釈し、凍結保管しておく
※iSeq 100 の場合は変性しないので注意

- RSB (illumina)
- 保冷用クラッシュアイス
- DNA 低吸着チューブ：0.5 mL、1.5 mL、2.0 mL(例：DNA LoBind Tubes, eppendorf)*
- マイクロチューブ：1.5 mL 平底*
- 0.2N NaOH (5 M NaOH を希釈して用時調製) *
- 200 mM Tris-HCl (pH 7.0)*
- HT1 (illumina) (iSeq では不要)
* シーケンサーによって異なる

4.5 illumina シーケンサーのラン

- iSeq 100 i1 Reagent (300 Cycles)
- MiniSeq Mid Output Kit (300 Cycle)
- MiniSeq High Output Kit (300 Cycle)
- MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycle)
- MiSeq Reagent Kit v2 Nano (300 Cycle)
- MiSeq Reagent Kit v2 Micro (300 Cycle)
- MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycle) 等
※ 試薬キット毎の解析可能株数は表 1 を参照

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 5 of 20
---	--	---

5. 実験操作

5.1 ゲノムDNAの調製

- 1) 4.1 に従って検体数分のビーズチューブを用意する。
- 2) 固形培地あるいは液体培地にて患者検体より分離培養された *M. tuberculosis* を固形培地 (Middlebrook 7H10 寒天培地、2%小川培地) に継代して培養する (2ヶ月まで)。または、搬入された固形培地の培養状態に問題ない場合はそのまま用いる
- 3) 使い捨て白金耳 (10 μ L) 1 エーゼ分の菌体を、ビーズチューブに移す
※菌体をかきとりにくい場合には、エーゼを滅菌水等で濡らしてから行うと良い。
※エーゼは基本的に引くのではなく、押しながらループの円内に菌を流し込むように採る。
※エーゼが下層のクロロホルムに接触すると徐々に溶解するので注意する。エーゼから菌体をチューブに移す際にはなるべく上層で行う。どうしても菌体がエーゼから離れない場合のみ、下層までエーゼを入れ、短時間で菌体に移すようにする
※ライブラリー調製に必要な DNA 量を得るためには、1/4 エーゼ以上の菌量が望ましい
- 4) VORTEX-GENIE2 で激しく攪拌 (2,850 rpm, 7 min) して菌体を破碎する
- 5) 遠心 (10,000 rpm, 10 min) 後、上清 600 μ L を Phase Lock Tube に移す
- 6) 50 μ L RNase A (0.65 μ g/ μ L) を加え、インキュベート (37°C, 20 min) する
- 7) 600 μ L PCIAA を添加・懸濁後、遠心 (3,500 rpm, 5 min) する
- 8) 手順 7) を繰り返す
- 9) 600 μ L クロロホルムを添加・懸濁後、遠心 (3,500 rpm, 10 min) して上清 500 μ L を新しい 1.5 mL 平底チューブに移す
※クロロホルムの懸濁は 50 回程度激しくシェイクする
- 10) 50 μ L 3 M 酢酸ナトリウム、500 μ L IPA を添加後、転倒混和して遠心 (15,000 rpm, 15 min) し、ゲノム DNA を沈殿させる
- 11) デカントで上清を廃棄後、軽く遠心し、残った IPA をピペットで完全に除去する
- 12) 1 mL 75% エタノールを加える
- 13) ペレットに留意して上清をピペットで除去する
- 14) 軽く遠心し、ペレットに留意して上清をピペットで完全に除去する
- 15) ペレットを 1 min 風乾する
- 16) ペレットを 50 ~ 100 μ L EB で溶解する
※DNA のしっかりとした沈殿が見られる場合は 100 μ L EB で溶解する。沈殿が見られない場合には 50 μ L で溶解する。高分子 DNA は溶解し難いため、4°C、オーバーナイト等の条件で DNA を完全に溶解する
- 17) 微量分光光度計を用いてサンプルを測定し、DNA の純度と濃度 (≥ 20 ng/ μ L) に問題がないことを確認する (6.1 参照)
- 18) Qubit 試薬を用いて、製品取扱説明書に従って二本鎖 DNA 濃度を測定する (図 1 参照) ※ DNA を正確に定量できればその他の方法でも可。吸光度法は精度が悪い

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 6 of 20
---	--	--

ので推奨しない

※ 手順 17) の DNA 濃度を参照し、必要に応じて Qubit 試薬測定範囲内になるように DNA を希釈しておく

※ 希釈したゲノム DNA 5 μL を 195 μL の Qubit working solution に加えて測定する。この際に、5 μL の付属の Standard #2 DNA 溶液(10 ng/ μL)を内部精度管理用に併せて測定すると良い

19) ゲノム DNA は 1~2 ヶ月程度は 4°C で保存し、長期の場合は -30°C で保存する

5.2 ライブラリーの調製

QIAseq FX DNA Library Kit を用いてライブラリーを調製する

※ 結核研究所ではコストを低減するためにオリジナルプロトコルの半量で実施している。ここでは半量で実施する場合のプロトコルを記載しているが、各自の責任において実施の可否を判断すること

※ 各試薬の使用後は、なるべく速やかに冷凍保管する

5.2.1 ゲノム DNA の断片化 (Fragmentation)

- 1) 手順 6) のサーマルサイクラー・プログラムを開始し、4°C で pause しておく
- 2) 表 3 に従ってゲノム DNA 溶液 5 μL を 20 ng/ μL に希釈するための EB 量を計算し、マイクロチューブ等へ加える。次にゲノム DNA 5 μL を加えて混合する
- 3) 氷上にて、マイクロチューブに 1 サンプルあたり 13.5 μL Nuclease-free water、2.5 μL 10x FX Buffer、5 μL FX Enzyme を混合後、ボルテックス、スピンドウンし、Fragmentation Master Mix を調製する (表 4 参照)
- 4) 氷上のアルミブロックに、新しい 8 連チューブあるいは 96 ウェルプレートにセットし、Fragmentation Master Mix を 20 μL ずつ分注する
- 5) 手順 2) で希釈したゲノム DNA 4 μL を加え、軽くボルテックスし、スピンドウンする。

※ 断片化反応は室温でも進行するので、必ず氷上で作業し、素早くスピンドウンすることが特に重要。可能な場合は 4°C に設定した 96 ウェルプレート用遠心機を使用する。

- 6) サーマルサイクラーを用い、以下の条件で Fragmentation 反応を行う

※ 必ず 4°C になっている状態でチューブまたは、プレートを入れる

ヒートリッド : 67°C

反応液量 : 24 μL

4°C	1 min
32°C	2 min 40 sec
65°C	30 min
4°C	∞

- 7) スピンドウン後、氷上のアルミブロックにセットする
- 8) 次工程のためにヒートリッドの加熱設定を解除して冷ます

5.2.2 アダプターの付加

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 7 of 20
---	--	---

- 1) Adapter プレートは、事前に 4°Cで解凍し、使用前に、軽くボルテックス、スピンドウンをする
- 2) 2.5 µL Adapter を各サンプルに加え、軽くボルテックス後、スピンドウンする
- 3) 氷上にて、マイクロチューブに 1 サンプルあたり 7.5 µL Nuclease-free water、10 µL 5x DNA Ligase Buffer、5 µL DNA Ligase を混合後、軽くボルテックス、スピンドウンし、Ligation Master Mix を調製する (表 4 参照)
- 4) 21 µL Ligation Master Mix を各サンプルに加え、軽くボルテックス、4°Cでスピンドウンする
- 5) サーマルサイクラーを用い、以下の条件で Ligation 反応を行う
ヒートリッド：温度設定なし (30°C前後に下がっていること)
反応液量：50 µL

20°C	15 min
4°C	∞
- 6) スピンドウンする

5.2.3 ライブラリーの精製

- 1) AMPure XP ボトルを室温に戻し、使用直前によく懸濁しておく
- 2) 32 µL AMPure XP beads を各サンプルに加え、よくボルテックスする
- 3) 室温で 5 min 静置後、スピンドウンする
- 4) 磁石スタンド上で 2 min 静置後、上清を除去する
- 5) 100 µL 80%エタノール (表 2 参照) を各サンプルに加え、30 sec 後、上清を除去する
- 6) 手順 5)を繰り返す
- 7) 180 µL 80%エタノールを各サンプルに加え、30 sec 後、上清を完全に除去する
- 8) 磁石スタンド上で、3 min ビーズを風乾する
- 9) 12 µL EB を各サンプルに加え、よくボルテックス、スピンドウンし、氷上にセットする

5.2.4 ライブラリーの増幅

- 1) 氷上にて、マイクロチューブに 1 サンプルあたり 0.75µL Primer Mix、12.5µL 2X HiFi PCR Master Mix を混合後、軽くボルテックス、スピンドウンし、PCR Master Mix を調製する (表 4 参照)
- 2) 12 µL PCR Master Mix を各サンプルに加え、軽くボルテックス、スピンドウンする
- 3) 以下の条件で PCR 反応を行う
ヒートリッド：105°C
反応液量：24 µL

98°C	2 min	1 cycle
98°C	20 sec	
60°C	30 sec	5 cycles
72°C	30 sec	

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 8 of 20
---	--	--

72°C	1 min	1 cycle
4°C	∞	1 cycle

- 4) 4°Cでスピンドウンする
- 5) すぐに次の手順に進まない場合、-30°Cで保存する

5.2.5 ライブラリーのpooling

- 1) 5.2.4 で調製したライブラリー溶液をボルテックス、スピンドウンする
- 2) 手順 1) の 8 連チューブあるいは 96 ウェルプレートに磁石スタンド上で 5 min 静置する
- 3) 1.5mL DNA 低吸着チューブ内で、各サンプルを等量ずつ混合する（プーリング量は表 5 参照）

5.2.6 ライブラリーのサイズ分画

- 1) ライブラリーにアガロースゲル電気泳動用のローディング・ダイを添加し、ボルテックス、スピンドウンする
※例：4 サンプルの場合、プーリング量は 80μL。6× Loading Buffer の場合は 13μL 加える
- 2) Mupid®-exU にゲルをセットする
- 3) TAE Buffer をゲル面ぎりぎりまで満たす
※ゲルのウェルに Buffer が入らないように注意する
- 4) ゲルにローディング・ダイ添加済みライブラリーをアプライし、サイズマーカーを左右 2 か所にアプライする（アプライウェル数とアプライ量は表 5 参照）
- 5) ピペットで TAE Buffer を追加することでウェル内を TAE Buffer で満たす
- 6) Mupid®-exU を 100 V 30 min に設定し、泳動を開始する
- 7) 3 分間泳動後、pause して、TAE Buffer をゲル全面が浸るまで追加する
※泳動中にゲルが移動しないよう、蓋の上から、左右の空きウェルにチップを刺してゲルを固定するとよい
- 8) 泳動終了後のアガロースゲルをゲル染色液に入れ、振とう機で振とうしながら、20 min 染色する
- 9) LED トランスイルミネーターを用いてゲル電気泳動像を撮影する
※DNA の断片化を防ぐため、UV トランスイルミネーターは使用しないこと
- 10) 防護メガネを装着し、カッターナイフにて 300 ~ 600 bp のゲルを切り出す
※ゲル切り出し作業前には手袋を交換し、他の DNA や別ライブラリーの混入がないよう注意する
- 11) 切り出したアガロースゲルを 2.0 mL DNA 低吸着チューブに入れる
※アガロースゲルがチューブに入りきらない場合は、1 ウェルずつ別チューブに入れ、各工程を進み、5.2.7 の手順 5) で同じ SV Minicolumn にアプライする
- 12) すぐに次の手順に進まない場合、-30°Cで保存する

5.2.7 ライブラリーのアガロースゲル精製

Promega Wizard SV Gel and PCR Clean Up System を用いて精製する

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 9 of 20
---	--	---

- 1) 切り出したアガロースゲルのゲル重量を計測する
- 2) 10 mg ゲル重量に対して、10 μ L の Membrane Binding Solution を加える
- 3) ゲルが完全に溶けるまで 65°Cにてインキュベートする
- 4) SV Column を Collection Tube に差し込んだ SV Minicolumn セット (キット付属) を準備する
- 5) ゲル溶解液 (最大アプライ量 800 μ L/回) を SV Minicolumn セットにアプライ、インキュベート (室温, 1 min) する
- 6) 遠心 (25°C, 14,000 rpm, 1 min) 後、フロースルーを廃棄する
- 7) ゲル溶解液が残っている場合は、アプライ、遠心 (25°C, 14,000 rpm, 1 min)、フロースルーの廃棄を繰り返す。
- 8) 800 μ L Membrane Wash Solution をアプライ、遠心 (25°C, 14,000 rpm, 1 min) 後、カラムを新しいキャップレスチューブへ移す
- 9) 500 μ L Membrane Wash Solution をアプライ、遠心 (25°C, 14,000 rpm, 5 min) 後、カラムを新しいキャップレスチューブへ移す
- 10) 空回し遠心 (25°C, 14,000 rpm, 1 min) 後、蓋を切った新しい 1.5 mL DNA 低吸着マイクロチューブへカラムを移す
- 11) EB をアプライ、インキュベート (室温, 2 min) する (溶出 EB 量は表 5 参照)
※カラムにラップを被せ、蒸発を防ぐ
- 12) 遠心 (25°C, 14,000 rpm, 1 min) 後、溶出液を 0.5 mL DNA 低吸着チューブに移す
- 13) Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従ってライブラリーの濃度を測定する (図 1.参照、測定濃度は表 6 に記載)
※ライブラリー調製日にランをする場合には、正確な濃度測定のため Duplicate で DNA 濃度測定しておく (1 試料あたり 2 本のチューブを調製・測定して平均値を採用する)
- 14) すぐに次の手順に進まない場合、-80°Cで保存する

5.3 ライブラリーの定量

- 1) -80°Cで保存した場合のみ、Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って調製済ライブラリーの濃度を測定する (図 1 参照)
※正確な濃度測定のため Duplicate で DNA 濃度測定しておく
- 2) ライブラリーのモル濃度を計算する (表 7 および表 7 の計算例参照)
※ライブラリー濃度 (ng/ μ L) はコントロール補正した値を使用する
※平均 DNA サイズ (bp) = ゲル抽出した範囲の中央値を使用する (中央値は 5.2.6.9 の画像から目測する。参考値 500 bp)
- 3) 表 7 に従ってライブラリーを変性・希釈するための RSB 量やローディング濃度に希釈するための希釈溶媒量を計算する

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 10 of 20
---	--	---

5.4 ライブラリーの変性、希釈

詳細は各シーケンサーの『Denature and Dilute Libraries』や『System Guide』に従う

※iSeqの場合は以下の資料を参照

『(追補版)ライブラリー調製とシーケンサー操作ガイド_iSeq版』

https://drive.google.com/drive/folders/1qYcA_dsv2gvToe4umTkXq3_723QzUv3L?usp=drive_link

5.4.1 iSeq 100 i1 (300 Cycles)

- 1) 測定された DNA モル濃度に従い、RSB にて 1 nM に希釈する (表 7 参照)
- 2) 1 nM ライブラリーをローディング濃度に希釈 (表 7 参照)
- 3) PhiX コントロールの添加 (2%程度、オプション)
- 4) ラン開始まで氷上で保管する (3 時間まで)

5.4.2 MiniSeq Mid/High (300 Cycles)

- 1) 測定された DNA モル濃度に従い、RSB にて 1 nM に希釈する (表 7 参照)
- 2) 1.5 mL 低吸着チューブに、1 nM ライブラリー 5 μ L と 0.1N NaOH 5 μ L を混ぜ合わせる
- 3) 室温で 5 分間インキュベートする
- 4) 200 mM Tris-HCl(pH 7.0)を 5 μ L 添加する
- 5) 変性済みライブラリーを含むチューブに、985 μ L の事前冷却済み HT1 を添加する
※5 pM の変性済みライブラリーが出来る
- 6) 変性済みライブラリーをローディング濃度に希釈 (表 7 参照)
- 7) PhiX コントロールの添加 (2%程度、オプション)
- 8) ラン開始まで氷上で保管する (3 時間まで)

5.4.3 MiSeq v2 (300 Cycles)

- 1) 測定された DNA モル濃度に従い、RSB にて 2 or 4 nM に希釈する (表 7 参照)
- 2) 1.5 mL 低吸着チューブに、2 or 4 nM ライブラリー 5 μ L と 0.2N NaOH 5 μ L を混ぜ合わせる
- 3) 室温で 5 分間インキュベートする
- 4) 変性済みライブラリーを含むチューブに、990 μ L の事前冷却済み HT1 を添加する
※10 or 20 pM の変性済みライブラリーが出来る
- 5) 変性済みライブラリーを HT1 にてローディング濃度に希釈 (表 7 参照)
- 6) PhiX コントロールの添加 (1%程度、オプション)
- 7) ラン開始まで氷上で保管する (3 時間まで)

5.4.3 MiSeq v3 (600 Cycles)

- 1) 測定された DNA モル濃度に従い、RSB にて 4 nM に希釈する (表 7 参照)
- 2) 1.5 mL 低吸着チューブに、4 nM ライブラリー 5 μ L と 0.2N NaOH 5 μ L を混ぜ合わせる
- 3) 室温で 5 分間インキュベートする
- 4) 変性済みライブラリーを含むチューブに、990 μ L の事前冷却済み HT1 を添加する

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 11 of 20
---	--	---

※20 pM の変性済みライブラリーが出来る

- 5) 変性済みライブラリーを HT1 にてローディング濃度に希釈 (表 7 参照)
- 6) PhiX コントロールの添加 (1%程度、オプション)
- 7) ラン開始まで氷上で保管する (3 時間まで)

5.5 illuminaシーケンサーのラン

各シーケンサーの操作手順に従ってランを行う。シーケンサーの起動、準備、使用前後の wash等の詳細は各System Guideに従って実施する

試薬カートリッジの融解方法は、表8を参照

イルミナシーケンサーより出力されるfastqファイル名は5.6を参考に決めておく

5.5.1 iSeq

- 1) カートリッジ準備
- 2) フローセル準備
- 3) 試薬カートリッジにライブラリー溶液のロード
- 4) フローセルのロード
- 5) シーケンスランの設定
- 6) カートリッジを装置にロード
- 7) ラン開始

※詳細手順は5.4リンク先参照

5.5.2 MiniSeq

- 1) 試薬カートリッジ準備
- 2) フローセル準備
- 3) 試薬カートリッジにライブラリー溶液のロード
- 4) シーケンスランの設定
- 5) フローセルのロード
- 6) カートリッジを装置にロード
- 7) 廃液ボトル内の液を捨て、空にする
- 8) ラン開始

5.5.3 MiSeq

- 1) 試薬カートリッジ準備
- 2) フローセル準備
- 3) シーケンスランの設定
- 4) フローセルの洗浄とロード
- 5) 試薬カートリッジにライブラリー溶液のロード
- 6) 試薬カートリッジを装置にロード
- 7) 廃液ボトル内の液を捨て、空にする
- 8) ラン開始

5.6 fastqファイルの命名(参考)

次の命名規則に従ってfastqファイル名を決める

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 12 of 20
---	--	---

- ・ fastqファイル名の最大文字数は19。英数字とハイフン(-)のみ利用可
- ・ fastqファイル名から株名とラン日が特定可能（fastqファイル名は少なくとも施設内で唯一無二であり、ファイル名が重複しない）
- ・ 同一検体を再ランする場合は再ラン回数分のrを末尾に追記するなどの対応をする
- ・ fastqファイル名には個人が特定可能な情報が含まれない
- ・ これからゲノム解読を導入する自治体に対しては、地方衛生研究所設置自治体に固有の識別子を加えたファイル名を推奨

参考例1) YMG2023-001

※山形県、2023に分離された、1番目の検体

参考例2) YMG2023-hoge

※山形県、2023に分離された、自治体菌株名”hoge”

※fastqファイル名から自治体名、分離年、等の情報が判断できるとゲノム解析結果(ハプロタイプネットワーク図等)の理解が容易になる

※ゲノム情報の共有時や公的DB等への登録時にfastqファイル名が公開される可能性がある

※ゲノム情報は数百から数万単位で蓄積される可能性がある。ファイル管理、バックアップ、検索性に適した命名法を考慮する必要がある

※自治体名の識別子案：

https://drive.google.com/drive/folders/1qYcA_dsv2gvToe4umTkXq3_723QzUv3L?usp=drive_link

※5.6は参考であり、必ずしも従う必要はない

6 Quality control

6.1 精製DNAのQC

- ・ 結核菌株から抽出・精製されたゲノム DNA 溶液(5.1)は、A260/A280 が 1.7 以上
※品質基準を満たさない場合は AMPure XP を用いて再精製する
- ・ Nano Drop One を使用した場合は、フェノールの混入が表示されないこと（フェノールが混入している場合、A260 < A270 になることが多い）
- ・ 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

6.2 ライブラリーのQC

- ・ ライブラリーの電気泳動像(5.2.6.9)において、大半のゲノム DNA が断片化し、500 bp 前後の DNA 断片が主体になっていること
※ 必要に応じてライブラリー-Fragmentation の時間(5.2.1 の手順 5, 2 min 40 sec, 32°C)を調整する

6.3 イルミナシーケンスのQC

- ・ シークエンズランにおけるデータ出力量とデータ出力における Q30 以上の割合がイルミナ社の保証値を上回ること(表 1 参照)
- ・ TGS-TB 解析において x40 カバレッジ以上のデータ量が得られていること

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 13 of 20
---	--	---

7 謝辞

本SOPは、AMED新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「結核対策困難化要因に対する総合的基礎研究」研究代表者 御手洗聡 課題管理番号 23fk0108607h0003、及び、厚生労働省 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究「わが国の病原体検査の標準化と基盤強化、ならびに、公衆衛生上重要な感染症の国内検査体制維持強化に資する研究」研究代表者 宮崎義継 課題管理番号 22HA2001 における研究の一環として作成した。

本SOPを作成するにあたり、国立感染症研究所および衛生微生物技術協議会結核レファレンス委員会6施設の先生方の助言と協力を得た。

国立感染症研究所 黒田誠
山形県衛生研究所 瀬戸順次
神奈川県衛生研究所 中嶋直樹
富山県衛生研究所 金谷潤一
大阪健康安全基盤研究所 山本香織
岡山県環境保健センター 河合央博
大分県衛生環境研究センター 塚本伸哉

本SOPは以下の執筆者により作成された。

村瀬良朗 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
下村佳子 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部
細谷真紀子 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部
永井水織 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部
大薄麻未 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
森重雄太 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 14 of 20
---	--	---

表 1 シーケンサーと主な試薬キット毎の抗酸菌全ゲノム解析可能株数*

解析可能株数の目安→	解析株数 上限の目安	データ出力量	出力データに占める Q30以上の割合	定価 (2022年6月)
iSeq 300 Cycle	4	≥1.2 Gb	≥80%	¥110,400
MiniSeq 300 Cycle Mid	10	≥2.4 Gb	≥80%	¥110,300
MiniSeq 300 Cycle High	30	≥7.5 Gb	≥80%	¥309,400
MiSeq v2 300 Cycle Nano	1	≥300 Mb	≥80%	¥58,300
MiSeq v2 300 Cycle Micro	5	≥1.2 Gb	≥80%	¥87,900
MiSeq v2 300 Cycle	18	≥4.5 Gb	≥80%	¥208,900
MiSeq v3 600 Cycle	36	≥15 Gb	≥75%	¥305,800

※マルチプレックスシーケンスした大半の株において、十分なデータ量 (x40カバレッジ) が得られることが期待される同時解析株数の理論値(目安)を我々の経験(MiSeq, NextSeq 550)等から推定した。

図1 General Qubit Assay Protocol

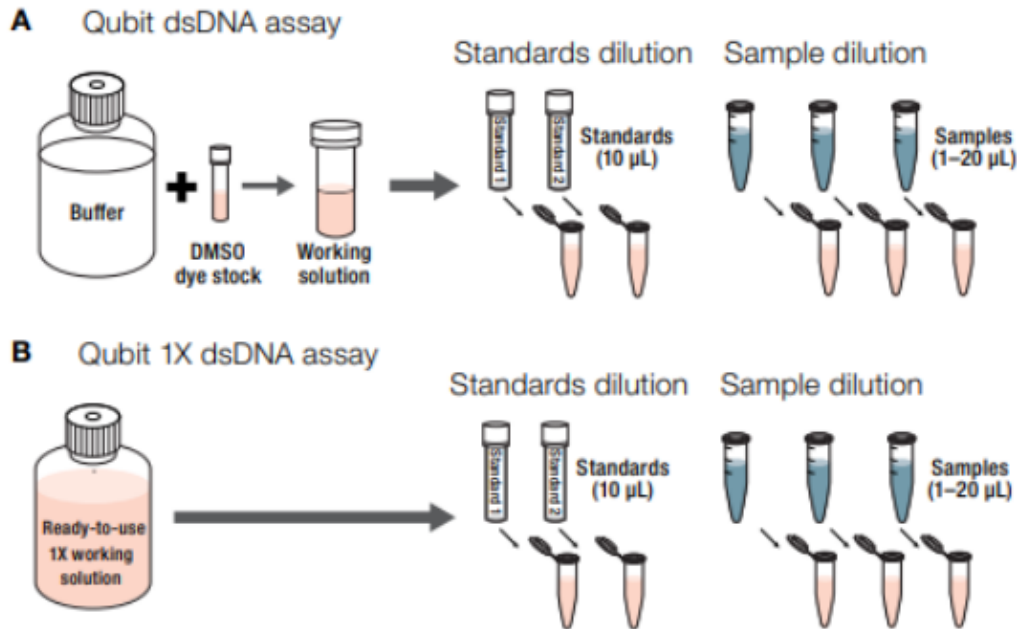


Figure 1. Workflow comparison for the (A) Qubit dsDNA and (B) Qubit 1X dsDNA assays. Standard Invitrogen™ Qubit™ dsDNA High Sensitivity (HS) and Qubit™ dsDNA Broad Range (BR) Assay Kits include a fluorogenic dye, buffer, and dsDNA standards. Prior to each assay, a fresh aqueous working solution needs to be prepared by diluting the dye stock in the provided buffer in a 1:200 ratio. Qubit 1X dsDNA assay kits eliminate this step by providing a ready-to-use working solution.

出典 www.thermofisher.com

表2 エタノール調製表

調製量	75%エタノール		80%エタノール	
	エタノール	H ₂ O	エタノール	H ₂ O
mL	mL	mL	mL	mL
1	0.75	0.25	0.8	0.2
2	1.5	0.5	1.6	0.4
3	2.25	0.75	2.4	0.6
5	3.75	1.25	4	1
10	7.5	2.5	8	2
15	11.25	3.75	12	3
20	15	5	16	4
30	22.5	7.5	24	6
40	30	10	32	8
50	37.5	12.5	40	10

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 16 of 20
---	--	---

表3 ゲノムDNAの濃度測定と20 ng/μLへの希釈

Sample ID	微量分光光度計			Qubit 二本鎖 DNA(ng/μL)	20 ng/μLへの希釈	
	DNA (ng/μL)	A260/A280	A260/A230		DNA (μL)	EB必要量 (μL)※
					5	
					5	
					5	

※ DNA 5μL を 20 ng/μL に希釈するために必要となる EB 量の計算式：
 (二本鎖DNA濃度[ng/μL]×5 / 20) - 5

表4 QIAseq FX 各Master Mixの調製表

Fragmentation Master Mix

サンプル数	1	4	12	24
Nuclease-free water (μL)	13.5	54	162	324
FX Buffer, 10x (μL)	2.5	10	30	60
FX Enzyme (μL)	5	20	60	120

Ligation Master Mix

サンプル数	1	4	12	24
Nuclease-free water (μL)	7.5	30	90	180
DNA Ligase Buffer, 5x (μL)	10	40	120	240
DNA Ligase (μL)	5	20	60	120

PCR Master Mix

サンプル数	1	4	12	24
Primer Mix (10 μM each) (μL)	0.75	3	9	18
HiFi PCR Master Mix, 2X (μL)	12.5	50	150	300

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 17 of 20
---	--	---

表5 サンプル数に対するライブラリープーリング量及びゲル切り出し用電気泳動アプライ量及びカラム精製後EB溶出量の目安

サンプル数	4	8	12	24
プーリング量 (μL)	20	20	20	15
電気泳動で使用するゲルのウェル数	2	2	3	3
ゲル 1 ウェルに対するライブラリーのアプライ量* (μL)	全量	50	50	50
カラム精製の DNA 抽出に使用する EB 量 (μL)	60	60	60	60

*アプライ量の上限は50 μL

表6 ライブラリーの濃度測定

Library Name	濃度 ng/μL

コントロール濃度	1回目濃度 ng/μL	2回目濃度 ng/μL
①		

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 18 of 20
---	--	---

表7 ライブラリーの濃度測定・モル濃度への変換・希釈

Qubit

Library Name	1回目濃度 ng/μL	2回目濃度 ng/μL	平均濃度 ng/μL	コントロール 補正濃度 ng/μL*	ライブラリー モル濃度 nM**

コントロール濃度	1回目濃度 ng/μL	2回目濃度 ng/μL	平均濃度 ng/μL
①			
②			

ライブラリーを変性・希釈濃度に希釈する

Library Name	目的濃度 nM	ライブラリー量 μL	RSB 量 μL	変性後濃度 pM

ローディング濃度に希釈する

Library Name	目的濃度 pM	ライブラリー量 μL	希釈溶媒量*** μL

* コントロール補正濃度計算式： $10(\text{ng}/\mu\text{L} : \text{STD濃度}) / \text{コントロール平均濃度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times \text{ライブラリー平均濃度}(\text{ng}/\mu\text{L})$

** ライブラリーモル濃度計算式： $\text{コントロール補正濃度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 1,000,000 / \text{平均DNAサイズ}(\text{bp}) / 660$

*** 使用する希釈溶媒は以下の通り

HT1: MiniSeq, MiSeq

RSB: iSeq

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 19 of 20
---	--	---

表7の計算例 (変性あり、MiSeq 用ライブラリーの例)

* iSeq の場合は変性なしのため、ライブラリーの変性・希釈以降は『(追補版)iSeqでのシーケンサーRUN v1.01』を参照の事

Library Name	1回目濃度 ng/μL	2回目濃度 ng/μL	平均濃度 ng/μL	コントロール 補正濃度 ng/μL	ライブラリー モル濃度 nM
Demo1	7.40	7.00	7.20	7.33	22.22

コントロール濃度	1回目濃度 ng/μL	2回目濃度 ng/μL	平均濃度 ng/μL
①	9.80	9.88	9.82
②	9.76	9.84	

ライブラリーを変性・希釈濃度に希釈する

Library Name	目的濃度 nM	ライブラリー量 μL	RSB 量 μL	変性後濃度 pM
Demo1	4	4	18.22	20

ローディング濃度に希釈する

Library Name	目的濃度 pM	ライブラリー量 μL	希釈溶媒量 μL
Demo1	12	360	240

Institution, laboratory name 結核研究所抗酸菌部 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> のゲノム解読に関する 標準作業手順書	Code: Version: no.1.2 Date of release: 2023/07/21 Page: 20 of 20
---	--	---

表8 カートリッジ解凍方法と安定限界 ※

		方法	融解時間	安定限界	
iSeq	1	ウォーターバス (20-25°C)	6 時間	最大 18 時間	ウォーターバスで融解の場合、-25°C ~ -15°Cで1日以上保管してから使用する
	2	冷蔵 (2-8°C)	36 時間	最大 1 週間	
	3	室温	9 時間	最大 18 時間	
MiniSeq	1	ウォーターバス (37°C)	35 分	最大 2 時間	
	2	ウォーターバス (19-25°C)	90 分	最大 24 時間	
	3	室温 (19-25°C)	5 時間	最大 24 時間	
	4	冷蔵 (2-8°C)	18 時間	最大 72 時間	
MiSeq Reagent Kit v2	1	ウォーターバス (19-25°C)	60 分	4°C 最大 1 週間	ランのセットアップする準備ができるまで、試薬カートリッジは最長 6 時間氷の上に置いておくか、または 2°C ~ 8°Cで保管する
	2	冷蔵 (2-8°C)	一晩		
MiSeq Reagent Kit v3	1	ウォーターバス (19-25°C)	60-90 分	4°C 最大 1 週間	
	2	冷蔵 (2-8°C)	一晩		

※ 各シーケンサーのSystem Guideより抜粋