

○背景

日本マイクロバイームコンソーシアム（JMBC）は、ヒト皮膚試料に関するマイクロバイーム計測の比較互換性の担保を目的に、それら測定のための標準的推奨プロトコル（standard operating procedure, SOP）の開発を産業技術総合研究所（産総研）、製品評価技術基盤機構（NITE）と共同で実施している。本活動は以下の方針のもと実施されている。

- マイクロバイーム関連計測データの信頼性を確保するとともに、比較互換性を担保するための標準基盤（標準物質や推奨プロトコル等）を整備し、現在進められているヒトマイクロバイーム研究や今後実施されるヒトマイクロバイーム研究における関連計測の標準化を推進する
- 精度が確認された標準物質によりマイクロバイーム計測の各ステップにおける統計的ばらつきを特定し、確かな科学的知見をもとに正確な計測を実現するプロトコルを開発、それらを推奨プロトコルとする
- 推奨プロトコルの選定には、計測の正確性を最も重要な指標としつつ、簡便さや国内の試薬供給ルートなど、産業界で広く活用されることを前提に必要な要素を満たすことを考慮する
- 技術の進展に対応した新たな推奨プロトコルや、JMBC 参画企業における独自のプロトコル開発を行うためのガイドラインを作成し、マイクロバイーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性を担保しつつ測定方法の多様性を許容する仕組みを作る

本推奨プロトコルは、ヒト皮膚のマイクロバイームを対象にしたメタゲノム解析を実施するプロトコルとして開発されたものである。

○SOP の構成

● 皮膚からのマイクロバイーム採取	2
● DNA 抽出	4
● DNA ライブラリ調製	9
● メタゲノムシーケンシング	22
● データ QC	23
● ヒト由来 DNA 配列を含むリード情報の削除	25
● 補足：16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析	26
● 補足：真菌の ITS、LSU rRNA 遺伝子アンプリコン解析	29
● 補足：モック標品を用いた精度管理	32
● 補足：spike-in（人工）配列 DNA を用いた精度管理	33
● 補足：皮膚を模擬したモデル表皮材料による微生物細胞回収に係る精度管理	35

○SOP 1：皮膚からのマイクロバイオーーム採取

・目的

- － マイクロバイオーーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚からのマイクロバイオーーム採取工程の手順について定める。

・SOP の利用者

- － 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため皮膚のマイクロバイオーームから DNA を得たい研究者・技術者
- － 皮膚のマイクロバイオーーム中の異なる細菌ならびに真菌種の細胞からなるべく均質に DNA を得たい研究者・技術者
- － 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- － ヒト皮膚のマイクロバイオーームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

回収したい DNA 量を多くしたい場合、例えばメタゲノムシーケンシング（SOP 3）を目的としたショットガン DNA ライブラリ（SOP 4）を調製する場合はスワブの使用を推奨。

品名	Code No.	単位	価格
COPAN フロックスワブ R80	502CS01	100 本	7,500 円

Tris-HCl (pH 7.5) 溶液、EDTA (pH 8.0) 溶液、Tween 20、ニッパー

・SOP (スワブ)

1. 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液を調製してオートクレーブ滅菌する。終濃度 0.5 % (vol/vol) となるように Tween 20 を添加して SCF-1 溶液を調製する¹⁾。
2. スワブを SCF-1 溶液で湿らせる。
3. 皮膚表面と柄が平行になるように持ち、表面全体をしっかりと擦るように 10-50 往復（例えば、2 cm×2 cm の範囲を片面 20 回ずつで計 40 回往復する等を参考として決定）、約 30 秒かけて拭い皮膚からマイクロバイオーームを採取する（図 1）。対象とする面積等は実験に応じて予め定めておく方が望ましい。

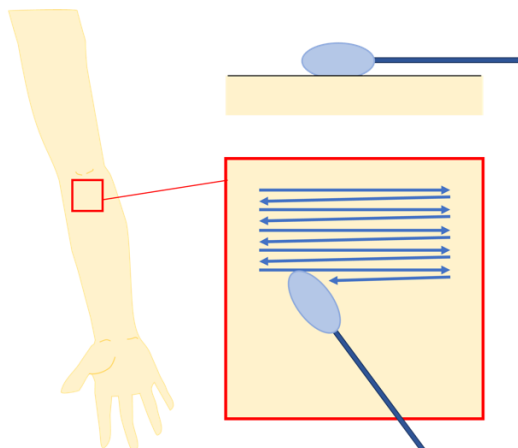


図 1. スワブを用いたマイクロバイオーーム採取例

4. スワブ頭部の柄を滅菌したニッパーで切断し、DNA 抽出（SOP 2）で使用する 700 μ L の FE 1 Buffer の入った Beads Tube 内へスワブ頭部を入れる。細かく裁断する必要はない。

1) Pamela McInnes. *et al.* (2009) Manual of Procedures for Human Microbiome Project Core

Microbiome Sampling Protocol A HMP Protocol # 07-001 Version Number: 9.0 21 Sep 2009. p7-8

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

高い DNA 回収量は望めないが、簡便かつ一般的な 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析（補足 SOP）または真菌の ITS、LSU rRNA 遺伝子アンプリコン解析（補足 SOP）のライブラリを調製する場合はテープの使用を推奨。

品名	Code No.	単位	価格
Corneofix	F20	100 枚	4,000 円

ピンセット（先端が丸く安全なもの）

・ SOP（テープ）

1. 滅菌したピンセットを使って皮膚へテープを軽く貼り付ける。テープのハンドリング時には、採取する方の皮膚などが直接テープに触れることを可能な限り防止し、他の微生物のコンタミネーションに注意する。
2. 10 秒間指等で軽く加圧する。
3. ピンセットで皮膚からテープを剥がし、DNA 抽出（SOP 2）で使用する 700 μ L の FE 1 Buffer（ニッポンジーン ISOSPIN Fecal DNA）の入った Beads Tube 内へテープを入れる。粘着面がチューブの内側になるようにチューブ壁に沿わせて入れる（テープに直接触れるなどのコンタミネーションに注意）。テープが硬くチューブに入れることが困難な場合があるので、初めて採取する場合は事前に採取工程を空試料でテストすることを推奨。この際、被験者の方の皮膚をピンセットで挟み皮膚を傷つける可能性があるため、使用するピンセットは柔らかいものを使用するとともに（先端が鋭い金属製のピンセットは避ける）、皮膚を損傷しないよう十分注意しテープを回収すること。

○SOP 2 : DNA 抽出

・目的

- ー マイクロバイーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、ヒト皮膚から採取したマイクロバイーム DNA 抽出工程の手順について定める。
- ー ヒト皮膚のマイクロバイームを対象としたメタゲノム解析（200-1,000 bp の断片を対象とした定量的なショットガンメタゲノム解析）を行うため、ヒト由来の DNA を除去し、異なる細菌種の細胞からなるべく均質に DNA を得るための推奨プロトコルを定める。

・SOP の利用者

- ー 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るためヒト皮膚のマイクロバイームから DNA を得たい研究者・技術者
- ー ヒトの皮膚のマイクロバイーム中の異なる細菌ならびに真菌種の細胞からなるべく均質に DNA を得たい研究者・技術者
- ー 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件



- ー ヒト皮膚のマイクロバイームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格
ニッポンジーン ISOSPIN Fecal DNA	315-08621	50 回用	48,000 円
MP-Biomedicals ビーズ式破碎装置（FastPrep 24）	6004-500	1 unit	1,280,000 円
BD Difco Skim Milk	232100	500 g	5,300 円
NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit	E2612S	6 reactions	42,400 円
	E2612L	24 reactions	146,000 円
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円
	A63881	60 mL	197,000 円
	A63882	450 mL	948,000 円

ISOSPIN Fecal DNA

構成品	容量	保存	備考
FE 1 Buffer	35 mL x 1	室温	FE1 Buffer 中に白い結晶が析出する場合は、混和しながら容器ごと 37-65 °C で加温し、結晶を完全に溶解させる
FE 2 Buffer	4.5 mL x 1	室温	
FB Buffer	40 mL x 1	室温	
FW Buffer	40 mL x 1	室温	
TE (pH 8.0)	5 mL x 1	室温	
RNase A (100 mg/mL)	0.5 mL x 1	室温	長期間使用しない場合は冷蔵もしくは冷凍保存（-20 °C）

Beads Tube	50 本 x 1	室温	2 mL 容量のチューブ中にビーズ有り 
Spin Column	50 本 x 1	室温	上部パーツ：カラム、下部パーツ：Collection Tube 

(<https://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/isospin-fecal-dna/isospin-fecal-dna.html> より改変)

イソプロパノール (室温)

NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit (E2612L)

構成品	容量	保存	備考
NEBNext MBD2-Fc Protein	0.4 mL x 1	-20 °C	
NEBNext Bind/wash Buffer (5x)	48 mL x 1	-20 °C	
16s rRNA Universal Gene Bacterial Control Primers (20 μM each, supplied as a mix)	0.048 mL x 1	-20 °C	
RPL30 Human DNA Control Primers (20 μM each, supplied as a mix)	0.048 mL x 1	-20 °C	
NEBNext Protein A Magnetic Beads	4.0 mL x 1	4 °C	

・ SOP

Protocol: ISOSPIN Fecal DNA

- スキムミルクを 4 g / 90 mL に超純水で調製する。3 回オートクレーブ滅菌 (121 °C, 20 分間) し、ブロッキング剤とする。小分けし、-20 °C 保管、一度融解したブロッキング剤は繰り返し使用しない方が望ましい。
- 700 μL の FE 1 Buffer、90 μL のブロッキング剤を Beads Tube に添加する。皮膚からサンプリングしたスワブまたはテープを Beads Tube へ入れる。あらかじめサンプリングしてマイクロチューブ等で保存してある場合、スワブはマイクロチューブを逆さまにして抽出用の Beads Tube へ落とし入れる。残った溶液はマイクロピペットで回収して Beads Tube へ移す。凍結保存して張り付いている場合は溶けてから Beads Tube へ移す。テープは清潔なピンセットでつまみ出し、ピンセットを 2 本使用して粘着面を内側に巻くように曲げて抽出用 Beads Tube へ入れる。
注) FE 1 Buffer 中に白い結晶が析出している場合は、あらかじめ容器ごと 37-65 °C で加温し、混和して結晶を完全に溶解させておく。
- 10 μL の RNase A を Beads Tube に添加する。

4. FastPrep-24 にスクリーキャップ装着後の Beads Tube をセットし、6.0 m/s で 1 分ビーティング後 5 分間の冷却（空冷等）を 3 回繰り返す（計 3 分間ビーティング）。
5. スピンドアウン後、90 μ L の FE 2 Buffer を添加し、十分に混合する。Step 4 の工程でまだ熱が残っている場合、室温に戻してから FE 2 Buffer を添加する。
6. 遠心分離（12,000 x g, 15 分間, 室温）を実施する。
7. 500 μ L の上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移す。ビーズやスワブまたはテープの一部が混入している場合は、再度遠心分離（12,000 x g, 15 分間, 室温）して、上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移す。上清を 500 μ L 回収できない場合は、回収量を測って次の操作へ進む。
8. 上清の液量に対して 0.4 倍量の FB Buffer および 0.4 倍量のイソプロパノールを添加し（上清が 500 μ L の場合、FB Buffer とイソプロパノールは各 200 μ L 添加）、転倒混和で十分に混合する。
9. Step 8 の混合液を全量 Spin Column に添加し、遠心分離（13,000 x g, 30 秒間, 室温）する。
10. Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。
11. 600 μ L の FB Buffer を Spin Column に添加し、遠心（13,000 x g, 1 分間, 室温）後、Step 10 と同じ作業を行う。
12. 600 μ L の FW Buffer を Spin Column に添加し、遠心（13,000 x g, 1 分間, 室温）後、Step 10 と同じ作業を行う。
13. 空の Spin Column を再度遠心（13,000 x g, 1 分間, 室温）し、残った FW Buffer を完全にスピンドアウンする。
14. Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブの上に乗せる。
15. 50 μ L の純水または TE (pH 8.0) をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
注) スワブまたはテープからの DNA 抽出において、メンブレンに純水や TE が浸透しづらい場合がある。メンブレンに浸透しない場合は、少量の純水や TE を滴下して数秒待ち、浸透してから残りを滴下する。
16. 遠心（13,000 x g, 1 分間, 室温）する。
17. DNA サンプルが 1.5 mL マイクロチューブの中に回収されていることを確認する。
18. Qubit® dsDNA HS Assay Kit 等の蛍光ベースの手法を用いて DNA サンプルの定量を実施する。以降の工程では吸光ベースの手法よりも蛍光ベースの手法による定量値を用いることを推奨。
注) ヒト由来サンプルの場合、皮膚のどの部位からサンプルを採取するかにより異なるが、一般的に Qubit® dsDNA HS Assay Kit 等の蛍光ベースの手法では定量できないほど少量の DNA しか得られないことが多い。もし必要があれば、16S rRNA 遺伝子等を対象とした定量 PCR による定量を推奨する。

Protocol: NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit

（補足 SOP アンプリコンライブラリ調製の場合はヒトゲノム除去の必要はない。）

このキットを使用した場合、ヒトゲノム由来 DNA を 20 - 80 %程度除去できることが確認されている。ただし、試料の状態等により除去率が大きく変動する。現時点ではこの変動をコントロールすることは困難。

Prebind MBD2-Fc Protein to Magnetic Beads

1. 抽出した DNA サンプルから一部または全量を、インプット DNA とする。インプット DNA 量に対して必要な MBD2-Fc-bound magnetic beads の量 (Y μ L) を以下の式から計算する。

$$Y = \text{MBD2-Fc-bound magnetic beads 量} (\mu\text{L}) = \text{インプット DNA (ng)} / 6.25 (\text{ng}/\mu\text{L})$$

MBD2-Fc-bound magnetic beads は、6.25 ng の input DNA に対して 1 μL 必要となる。例えば、インプット DNA が 1,000 ng の場合、MBD2-Fc-bound magnetic beads は 160 μL 必要となる。ただし、インプット DNA が 100 ng 以下の場合、100 ng の場合に必要となる量 (MBD2-Fc-bound magnetic beads : 16 μL) を使用する。なお、インプット DNA 量は、その後のライブラリ調製等 (下記参照) で必要となる DNA 量から決定する。

2. Protein A Magnetic Beads を穏やかにピペティングして均質にする。または、ローテーター (25 rpm) またはシェーカー (400 rpm) 等で 4 °C、15 分攪拌する。ボルテックスミキサーは使用しない。
3. Bind/wash Buffer (5x) を 4 倍量の DNase-free water で希釈し、1x Bind/wash Buffer を作成、氷上に置く。
注) 1x Bind/wash Buffer は、1 サンプルに対して最大 2.5 mL 程度必要となる。
4. (0.1 x Y) μL の MBD2-Fc protein と Y μL の Protein A Magnetic Beads を 1 つのチューブ内で混合する。ビーズが完全に均質になるまで少なくとも 5~10 回ピペティングする。
インプット DNA が 1,000 ng の場合、16 μL の MBD2-Fc protein と 160 μL の Protein A Magnetic Beads を 1 つのチューブに加える。
5. Step 4 の混合物を室温で 10 分間、ローテーター (25 rpm) またはシェーカー (400 rpm) 等で攪拌する。液量が少ない場合はローテーターではうまく攪拌できない場合があるのでシェーカー等を利用して良い。
6. チューブをスピンドウンして、マグネットスタンドに 2~5 分間、またはビーズがチューブの壁面に集まり溶液が透明になるまで静置する。
7. 上清をピペットで注意深く除去、廃棄する。
8. Step 3 で作成した 1x Bind/wash Buffer (氷上) をチューブに 1 mL 加え、ビーズを洗浄する。ビーズが完全に均質になるまで、少なくとも 5~10 回ピペティングする。
9. Step 8 の混合物を室温で 3 分間、ローテーター (25 rpm) またはシェーカー (400 rpm) 等で攪拌する。液量が少ない場合はローテーターではうまく攪拌できない場合があるのでシェーカー等を利用して良い。
10. チューブをスピンドウンして、マグネットスタンドに 2~5 分間、またはビーズがチューブの壁面に集まり溶液が透明になるまで静置する。
11. 上清をピペットで注意深く除去、廃棄する。
12. Step 8~11 を再度行う。
13. マグネットスタンドからチューブを取り出し、Y μL の 1x Bind/wash Buffer (氷上) でビーズを再懸濁する。数回ピペティングする。
14. 上記の操作で得られた溶液が MBD2-Fc-bound magnetic beads (メチル化 DNA 抗体とマグネットビーズが結合したもの) である。本溶液は 4 °C で 7 日間安定して保存できる。

Capture Methylated Host DNA

1. Y μL の MBD2-Fc-bound magnetic beads に抽出 DNA (最大 200 μL まで) を加える。
2. Bind/wash Buffer (5x) を最終濃度が 1x となるように加える。ビーズが完全に均質になるまで、少なくとも 5~10 回ピペティングする (例えば、input DNA が 40 μL の場合、10 μL の

Bind/wash Buffer (5x) を加えてピペティングする)。

3. 1.5 mL チューブを使用する場合は、Step 2 の混合物を室温で 15 分間、ローテーター (25 rpm) またはシェーカー (400 rpm) 等で攪拌する。PCR チューブを使用する場合は、Step 2 の混合物を室温で 15 分間、シェーカー (1200 rpm) で 5 秒攪拌後 3 秒静止を繰り返す。液量が少ない場合はローテーターではうまく攪拌できない場合があるのでシェーカー等を利用しても良い。

Collect Enriched Microbial DNA

1. チューブをスピンドウンして、マグネットスタンドに 5 分間、またはビーズがチューブの壁面に集まり溶液が透明になるまで静置する。
2. 上清を新しいチューブに回収する。 -20 °C で保存するか、速やかに精製へ進む。
注) サンプルの精製法として Agencourt® AMPure® XP Beads (以下、AMPure XP Beads とする) を使用方法とエタノール沈澱法がある。本 SOP では AMPure XP Beads を使用方法を記載。

AMPure XP Beads

1. AMPure XP Beads をボルテックスミキサーで懸濁する。30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁をしてから使用する。
2. ヒト DNA を除去したマイクロバイーム DNA サンプル (上記 Collect Enriched Microbial DNA の Step2 で得られた溶液) に 1.8 倍量の AMPure XP Beads を添加する。この際、添加後の容量がチューブの上限以上であるときは 2 つ以上のチューブに分ける。
3. AMPure XP Beads を添加後の溶液を 10 回以上ピペティングする。
4. サンプルを室温で 5 分間以上インキュベートする。
5. チューブを軽くスピンドウンして、マグネットスタンドに 5 分間、または溶液が透明になるまで静置する。
6. 注意深く上清を除去、廃棄する。
7. マグネットスタンドに静置したチューブに 80 %エタノールを 400 μ L 加え、洗浄する。室温で 30 秒間インキュベートし、注意深く上清を除去、廃棄する。
8. Step 7 をもう一度繰り返し行い、マグネットビーズに対して計 2 回の洗浄を行う。2 回目の洗浄後に可能な限りエタノールを取り除く。
9. マグネットスタンドに静置したチューブの蓋を開け、最大 5 分間までビーズを乾燥させる。
注) 収量が低くなってしまうため、ビーズを過度に乾燥させない。ビーズが濃い茶色や光沢のあるうちに溶出する。
10. チューブをマグネットスタンドから取り出す。 **20 μ L** の純水を加えて、ビーズから DNA を溶出する。
11. ピペティングを 10 回行った後、室温で 2 分間以上インキュベートする。マグネットスタンドに静置する前に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 5 分間、または溶液が透明になるまで静置する。注意深く上清全量を新しいチューブに回収する。
13. Qubit® dsDNA HS Assay Kit 等の蛍光ベースの手法を用いて上記回収溶液中の DNA を定量する。
注) ヒト由来サンプルの場合、DNA のインプット量が少ないためこの方法では定量できない場合がほとんどであり、DNA 定量は必須でない。

○SOP 3 : DNA ライブラリ調製

・目的

- － マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、ヒト皮膚のマイクロバイオームから抽出した DNA からのライブラリ調製工程の手順について定める。

・SOP の利用者

- － 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため皮膚のマイクロバイオームから抽出された DNA をもとに Illumina シークエンサ (NextSeq を想定) 用のショットガン DNA ライブラリを調製したい研究者・技術者
- － 皮膚のマイクロバイオームの異なる細菌ならびに真菌種の細胞からなるべく均質に DNA を得たい研究者・技術者
- － 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- － ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること
- － ライブラリの評価に用いる電気泳動装置は、electropherogram を出力できるものを用いる (例えば、アジレント・テクノロジー社 Bioanalyzer、アジレント・テクノロジー社 TapeStation、島津製作所社マイクロチップ電気泳動装置、QIAGEN 社 QIAxcel、アズワン社 Fragment Analyzer 等)。プロトコル中では TapeStation 等と表記する。

ライブラリ調製キットは下記の 2 種類がある。すなわち、1) QIAseq FX DNA Library Kit、および 2) NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina を推奨する。ヒト皮膚由来サンプルは一般的に DNA の収量が少ないため、2) NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina の使用を推奨する。あらかじめ全てのサンプルの DNA 収量が十分確保できることが見込まれる場合は 1) QIAseq FX DNA Library Kit を使用することも可能である。ただし、実験結果の比較互換性を担保するためには、1 つの実験系において使用するキットは一種類に統一することが望ましい。

1) 回収 DNA 量が十分であり QIAseq FX DNA Library Kit を使用する場合 (300 pg 以下は推奨しない)

- ・準備 (使用機器・試薬等) ※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格
QIAseq FX DNA Library CDI Kit (24)	180483	24 反応分	122,000 円
QIAseq FX DNA Library CDI Kit (96)	180484	96 反応分	446,000 円
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円
	A63881	60 mL	197,000 円
	A63882	450 mL	948,000 円

QIAseq FX DNA Library CDI Kit (24)

構成品	数量	保存	Cap color
FX Enzyme Mix	1 tube	-30 to -15 °C	Violet
FX Buffer, 10x	1 tube	-30 to -15 °C	Blue

FX Enhancer	1 tube	-30 to -15 °C	Black
DNA Ligase	1 tube	-30 to -15 °C	Red
DNA Ligase Buffer, 5x	1 tube	-30 to -15 °C	Yellow
Adapter Plate 24-plex Illumina	1 plate	-30 to -15 °C	N/A
RNase-Free Water (1.9 mL/2)	2 tubes	-30 to -15 °C	Clear
HiFi PCR Master Mix, 2x, (0,30/2) , KG	2 tubes	-30 to -15 °C	Green
Primer Mix Illumina Libr. Amp 12rxn (20 µL)	2 tubes	-30 to -15 °C	Clear

QIAseq FX DNA Library CDI Kit (96)

構成品	数量	保存	Cap color
FX Enzyme Mix	1 tube	-30 to -15 °C	Violet
FX Buffer, 10x	1 tube	-30 to -15 °C	Blue
FX Enhancer	1 tube	-30 to -15 °C	Black
DNA Ligase	1 tube	-30 to -15 °C	Red
DNA Ligase Buffer, 5x	2 tubes	-30 to -15 °C	Yellow
Adapter Plate 96-plex Illumina	1 plate	-30 to -15 °C	N/A
RNase-Free Water (1.9 mL/2)	3 tubes	-30 to -15 °C	Clear
HiFi PCR Master Mix, 2x (1.25/2 mL) , KG	2 tubes	-30 to -15 °C	Green
Primer Mix Illumina Library Amp, 10 µM	1 tube	-30 to -15 °C	Clear

・インプット DNA 量は PCR 有りのプロトコルの場合 1-100 ng、PCR-free のプロトコルの場合 100-1000 ng とし、PCR グレードの水、10 mM Tris, Buffer EB (QIAGEN)、Low-EDTA-TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 0.1 mM EDTA) 等を溶媒として用いる (1 x TE は使用しない)。

・サンプル量や実験目的に応じて PCR 有りのプロトコルか PCR-free のプロトコルを選択する。PCR 有りの場合、できるだけインプット DNA 量を多くする (≦100 ng) ことを推奨。PCR-free の場合、調製後ライブラリの定量 PCR による定量が必要。現実的には PCR 有りのプロトコルで対応する必要があると考えられる。

・SOP

Protocol: Fragmentation, End-Repair and A-addition

1. Table 1 に従ってサーマルサイクラーをプログラムする。断片化反応時間 (Table 1. Step 2) は、Table 2 を参考に DNA インプット量に応じて決定する。リッドの温度は 70 °C に設定する。

Table 1. Input DNA (1–1000 ng) free of EDTA, Buffer EB, or in 0.1 x TE.

Step	Incubation temperature	Incubation time
1	4 °C	1 min
2	32 °C	3-20 min (see Table 10)
3	65 °C	30 min
4	4 °C	Hold

Table 2. Guideline for choosing the initial fragmentation time.

Input DNA	Incubation time
≦ 10 ng	8 min (with FX enhancer)
50 ng	12 min
100 ng	10 min
500 ng	9 min
1000 ng	8 min

注) ライブラリのインサートサイズが 350 bp 程度になることを想定した反応時間を記載しているが、酵素による断片化効率はサンプルの品質等によって異なり、実際の断片長は想定より短くなる場合がある。インサートサイズを変更する場合はキットのマニュアルに従って反応時間を変更する。

注) DNA インプット量が 10 ng 以下の場合は FX enhancer を添加した条件 (Table 4) における反応時間となる。

2. プログラムを起動する。サーマルサイクラーブロックが 4 °C に達したら、プログラムを一時停止する。
3. インプット DNA 量が 10 ng より多い場合は Table 3、10 ng 以下の場合は Table 4 に従って、氷上の PCR プレートまたはチューブで FX reaction mix を調製する。穏やかにピペティングしてよく混合する (ボルテックスしないで混合する)。

Table 3. FX reaction mix setup (per sample) for >10 ng input DNA

Component	Volume (μL)
FX Buffer, 10x	5
Purified DNA	≦35 (variable)
Nuclease-free water	≧0 (variable)
Total without FX Enzyme Mix	40

注) Purified DNA と Nuclease-free water の合計が 35 μL になるように調製。

Table 4. FX reaction mix setup (per sample) for 1-10 ng input DNA

Component	Volume (μL)
FX Buffer, 10x	5
Purified DNA	≦32.5 (variable)
FX Enhancer	2.5
Nuclease-free water	≧0 (variable)
Total without FX Enzyme Mix	40

注) Purified DNA と Nuclease-free water の合計が 32.5 μL になるように調製。

4. 各 FX reaction mix に 10 μL の FX Enzyme Mix を加え、ピペティングしてよく混ぜる。
5. PCR プレートまたはチューブを軽くスピンドウンし、直ちに予冷サーマルサイクラー (4 °C) に移す。サーマルサイクラープログラムを再開する。

- サーマルサイクラープログラムが完了し、サンプルブロックが 4 °C に戻ったら、PCR プレートまたはチューブを取り出して氷上に置く。
- 直ちに **Protocol: Adapter Ligation** の工程に進む。

Protocol: Adapter Ligation

- アダプタープレートを保護している蓋を外し、使用する各アダプターウェルのホイルシールを突き刺して DNA アダプターを 5 μ L ずつ採取し、FX reaction product 50 μ L に添加する。各サンプルに使用するアダプターウェルのバーコードを記録する。

注) DNA インプット量が 10 ng 未満の場合は、Table 5 に従ってアダプターを希釈する。

Table 5. Adapter dilution factors

Sample DNA amount	Adapter dilution
20–99 pg	1:1000
100–999 pg	1:100
1–9 ng	1:10

- アダプタープレートの保護蓋を戻し、未使用のアダプターを凍結保存する。アダプタープレートは少なくとも 10 回までの凍結融解サイクルで安定である。

注) 1 つのライゲーション反応につき、ただ 1 つのアダプターを使用すること。ホイルシールを貫通した後は、アダプターは再使用しない。

- 氷上で新しい PCR プレートまたはチューブに Table 6 に従って Ligation master mix を調製する。ピペッティングしてよく混ぜる。

Table 6. Ligation master mix setup (per sample)

Component	Volume (μ L)
Ligation Buffer, 5x	20
DNA ligase	10
Nuclease-free water	15
Total	45

- Step 3 で調製した Ligation master mix 45 μ L を FX reaction product 55 μ L に添加し (合計 100 μ L)、ピペッティングでよく混ぜる。Ligation reaction mix を 20 °C で 15 分間インキュベートする。

注) サーマルサイクラーのリッドは加温しない、もしくは開けた状態にすること。

Protocol: Adaptor Ligation DNA Cleanup

1. 80 μL (サンプル液量の 0.8 倍量) の懸濁した AMPure XP Beads を Ligation reaction product 100 μL に添加し、ピペティングしてよく混ぜる。AMPure XP Beads は 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁をしてから使用する。
2. Step 1 の混合物を室温で 5 分間インキュベートする。チューブをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、ビーズをペレット化した後、上清を慎重に捨てる。
注) 溶液が透明にならない場合、マグネットに接していない部分に対流するようにゆっくりとピペティングする。以降のビーズ精製の工程についても同様。
3. マグネットスタンド上で 200 μL の 80 %エタノールを加える。マグネットスタンド上でビーズをペレット化し、上清を捨てる。エタノール洗浄は 2 回実施する。できるだけエタノールを除去する。
4. チューブの蓋を開け、ビーズをマグネットスタンド上で 5-10 分間またはビーズが乾くまで室温でインキュベートする。マグネットスタンドからチューブを取り外す。
注) ビーズを過度に乾燥させると、DNA 回収率が低下する可能性がある。
5. 52.5 μL の EB Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、ビーズを再懸濁して DNA を溶出する。チューブをマグネットスタンド上に 1-2 分間 (溶液が透明になるまで) 静置し、ビーズをペレット化した後、上清 50 μL を新しいチューブに回収する。
6. Step 5 で回収した上清 50 μL に AMPure XP Beads を 50 μL 添加し、ピペティングでよく混合する。
7. Step 2-4 の操作をもう一度繰り返し行う。
8. 26 μL の EB Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、ビーズを再懸濁して DNA を溶出する。チューブをマグネットスタンド上に 1-2 分間 (溶液が透明になるまで) 静置し、ビーズをペレット化した後、上清 23.5 μL を新しいチューブに回収する。
9. PCR-free のプロトコルの場合は Step 10 へ、PCR 有りのプロトコルの場合は **Protocol: Amplification of Library DNA** へ進む。すぐに次の Step へ進まない場合はライブラリ溶液を $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存する。
10. (PCR-free の場合)
Tape Station 等を用いて電気泳動を実施し、ライブラリの濃度および断片長を確認する。また、定量 PCR (Kapa Library Quantification Kit、QIAseq Library Quant Assay Kit 等を使用) を実施しライブラリの濃度を確認する。ライブラリ溶液はシーケンスに使用するまで $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存する。

(PCR 有りの場合は以降のステップに進む)

Protocol: Amplification of Library DNA

1. Table 7 に従って、サーマルサイクラーをプログラムする。リッドの温度は $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定する。PCR サイクル数は、Table 8 を参考に DNA インプット量に応じて設定する。

Table 7. Library amplification cycling conditions

Time	Temperature	Number of cycles
2 min	$98\text{ }^{\circ}\text{C}$	1
20 s	$98\text{ }^{\circ}\text{C}$	6-12 (see Table 8)

30 s	60 °C	
30 s	72 °C	
1 min	72 °C	1
∞	4 °C	Hold

Table 8. Guideline for PCR cycles

Input DNA	Number of cycles
1 ng	12
10 ng	10
50 ng	8
100	6

- Table 9 に従って氷上の PCR プレートまたはチューブで Library reaction mix を調製する。

Table 9. Reaction mix for library enrichment

Component	Volume (μL)
HiFi PCR Master Mix, 2x	25
Primer Mix (10 μM each)	1.5
Library DNA	23.5
Total reaction volume	50

- PCR プレートまたはチューブをサーマルサイクラーに設置し、サーマルサイクラープログラムを開始する。
- サーマルサイクラープログラムが完了したら、懸濁した AMPure XP Beads 50 μL を各 Library amplification reaction product (50 μL) に加え、十分にピペッティングを行う。AMPure XP Beads は 30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁してから使用する。
- Step 4 の混合液を室温で 5 分間インキュベートする。チューブをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、ビーズをペレット化した後、上清を慎重に捨てる。
- マグネットスタンド上で 200 μL の 80 %エタノールを加える。マグネットスタンド上でビーズをペレット化し上清を捨てる。エタノール洗浄は 2 回実施する。できるだけエタノールを除去する。
- チューブの蓋を開け、マグネットスタンド上で 5-10 分間、またはビーズが乾くまで室温でインキュベートする。その後マグネットスタンドからチューブを取り外す。
注) ビーズを過度に乾燥させると、DNA 回収率が低下する可能性がある。
- 25 μL の Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) に再懸濁して DNA を溶出する。チューブをマグネットスタンド上に 1-2 分間 (溶液が透明になるまで) 静置し、ビーズをペレット化した後、23 μL の上清を慎重に新しいチューブに移す。
- Tape Station 等を用いて電気泳動を実施し、ライブラリの濃度および断片長を確認する。

注) ライブラリは、断片化 DNA のサイズに 120 bp を加えたサイズを中心とした分布を示すはずである (Figure.1 を参照)。ライブラリの長さの増加は、DNA 断片へのシーケンシングアダプターの追加を反映している。

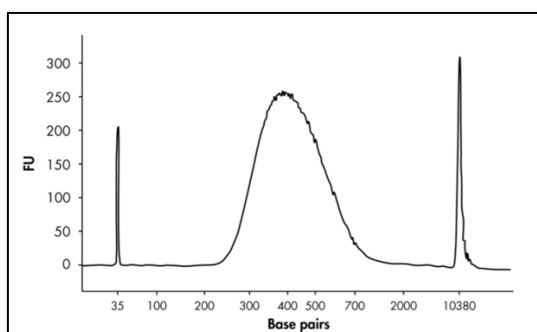


Figure 1 Capillary electrophoresis device trace data

(QIAGEN QIAseq FX DNA Library Kit Handbook より引用)

10. 必要に応じて定量 PCR ベースの方法 (Kapa Library Quantification Kit, QIAseq Library Quant Assay Kit 等を使用)、またはそれに準ずる方法を使用してライブラリの定量を実施する (通常、PCR 増幅後のライブラリの場合 TapeStation 等での定量で十分であり、定量 PCR は必須ではない)。
11. 精製したライブラリは、シーケンシングに使用する準備ができるまで、 -20°C で保存する。

2) 300pg 以下の DNA を用いて NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina を使用する場合
・準備 (使用機器・試薬等) ※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格
NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina	E7805S	24 反応分	122,000 円
	E7805L	96 反応分	450,000 円
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Dual Index Primers Set 1	E7600S	96 反応分	85,000 円
	E7780S	96 反応分	85,000 円
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円
	A63881	60 mL	197,000 円
	A63882	450 mL	948,000 円

NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina

構成品	数量	保存	Cap color
NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	1 tube	-20°C	Yellow
NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	1 tube	-20°C	Yellow
NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	1 tube	-20°C	Red
NEBNext Ligation Enhancer	1 tube	-20°C	Red
NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	1 tube	-20°C	Blue
TE Buffer (1x)	1 tube	-20°C	N/A

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina

構成品	数量	保存	Cap color
NEBNext Adaptor for Illumina	1 tube	-20 °C	Red
USER® Enzyme	1 tube	-20 °C	Red
NEBNext i5xx Primer	8 tubes	-20 °C	White
NEBNext i7xx Primer	12 tubes	-20 °C	Orange/Green

・インプット DNA 量は 0.1-100 ng とし、1 x TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 1 mM EDTA) 、Low-EDTA-TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 0.1 mM EDTA) 、PCR グレードの水等を溶媒として用いる。

・DNA 液量が 26 μL 未満の場合は、キット付属の TE を加えて最終液量を 26 μL とする。

・ SOP

Protocol: Fragmentation/End Prep

1. 37 °C の反応中、DNA の断片化とエンドプレップの処理を同時に行い、15 分の反応時間でインサートサイズが 350 bp 程度のライブラリを得られる。インサートサイズの変更やサンプルによってさらに最適化が必要な場合は、Table 10 を参考にして、目的の断片化サイズの反応時間を設定する。Figure 1 は典型的な断片化パターンを示す。

Table 10

FRAGMENTATION SIZE	INCUBATION @ 37 °C	OPTIMIZATION
100 bp – 250 bp	30 min	30–40 min
150 bp – 350 bp	20 min	20–30 min
200 bp – 450 bp	15 min	15–20 min
300 bp – 700 bp	10 min	5–15 min
500 bp – 1 kb	5 min	5–10 min

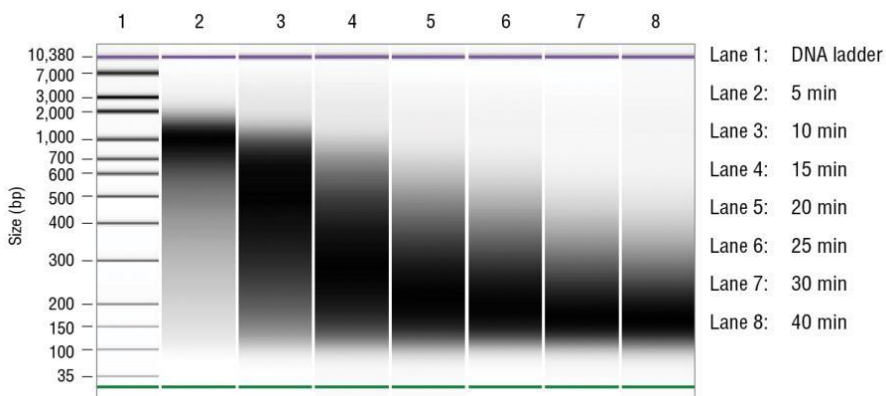


Figure 1: Example of size distribution on a Bioanalyzer®. Human DNA (NA19240) was fragmented for 5-40 min.

(NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina INSTRUCTION MANUAL より引用)

- Ultra II FS Reaction Buffer を完全に融解する。沈澱や結晶（主にマグネシウム）が見られる場合、ピペティングでこれらをできる限り細かくして、ボルテックスする。使用まで氷上で保存する。仮に沈澱や結晶が残存していても性能に影響はない。
- Ultra II FS Enzyme Mix を 5-8 秒間ボルテックスして氷上で保存する。
注) Enzyme Mix は必ずボルテックスで混合する。混合が不十分な場合は断片化効率が低下する。
- 0.2 mL PCR チューブに Table 11 の試薬を添加する。

Table 11

COMPONENT	VOLUME PER ONE LIBRARY
DNA	26 μ L
(yellow) NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	7 μ L
(yellow) NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	2 μ L
Total Volume	35 μ L

- 5 秒間ボルテックスして、スピンドウンする。
- Heat lid を 75 °C に設定したサーマルサイクラー内にチューブを設置し、以下のプログラムを実行する。
 - 37 °C で 15 分（反応時間は Table 10 で設定）
 - 65 °C で 30 分
 - 4 °C で保持
- サンプルを -20 °C で保存することが可能。わずかなライブラリ収量低下（約 20 %）が起きる場合があるため、次ステップを行ってから保存することを推奨する。

Protocol: Adaptor Ligation

- Table 12 を参考にして、(red) NEBNext Adaptor for Illumina を 10 mM Tris-HCl + 10 mM NaCl (pH 7.5-8.0) で希釈する。

Table 12

INPUT	ADAPTER DILUTION (VOLUME OF ADAPTOR: TOTAL VOLUME)	WORKING ADAPTOR CONCENTRATION
100 ng – 500 ng	No Dilution	15 μ M
5 ng – 99 ng	10-Fold (1:10)	1.5 μ M
less than 5 ng	25-Fold (1:25)	0.6 μ M

注) サンプルのインプット量及び種類に応じて、アダプター希釈率を最適化することが必要な場合もある。ここには出発点として一般的な希釈率が示してある。

- FS Reaction Mixture に Table 13 の試薬を追加する。Adaptor for Illumina は最後に添加する。

Table 13

COMPONENT	VOLUME
FS Reaction Mixture	35 μ L
(red) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	30 μ L
(red) NEBNext Ligation Enhancer	1 μ L
(red) NEBNext Adaptor for Illumina	2.5 μ L
Total Volume	68.5 μ L

注) Ultra II Ligation Master Mix は、数回ピペッティングして混合してから反応液に添加する。

注) Ultra II Ligation Master Mix 及び Ligation Enhancer は事前に混合しておくことが可能であり、混合物は 4 °C で 8 時間以上安定である。アダプターの事前混合は避け、必ず最後に添加する。

- 100 μ L または 200 μ L のピペットを 50 μ L にセットし、10 回以上ピペッティングして完全に混合する。スピンドウンによりチューブ内の側面から全液体を回収する。

注) Ultra II Ligation Master Mix は粘性が非常に高い。ライゲーション反応溶液の混合が不完全であるとライゲーション効率が低下するため十分に混合すること。少量の気泡が存在しても反応効率には影響しない。

- Heat lid をオフにして、サーマルサイクラー内で 20 °C で 15 分間インキュベーションする。
- Ligation Mixture に (red) USER Enzyme を 3 μ L 追添加する。
- よく混合し、Heat lid を 47 °C 以上に設定したサーマルサイクラー内で、37 °C で 15 分間、インキュベーションする。
- サンプルは-20 °C で一晩保存可能。

Protocol: Cleanup of Adaptor-ligated DNA

- AMPure XP Beads をボルテックスして懸濁する。30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁をしてから使用する。
- 懸濁したビーズ 57 μ L (ライゲーション反応液量の 0.8 倍量) を Ligation Mixture に添加する。10 回以上ピペッティングして十分に混合する。最後のピペッティングで、ピペットチップから全ての液体を排出する。3-5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にスピンドウンする場合には、ビーズが沈殿する前に必ず遠心機を停止する。
- サンプルを静置して、5 分以上、室温でインキュベーションする。
- チューブまたはプレート適切なマグネットスタンド上に設置し、ビーズを上清から分離する。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。
- 5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清を注意深く除去して廃棄する。ビーズにはターゲット DNA が結合しているため、触れないように注意する (ビーズを廃棄しないこと)。なお、上清には目的サイズより小さい DNA (アダプターを含む) が残っている。
- マグネットスタンド内にチューブまたはプレートを設置したまま、80 %エタノール 200 μ L (用時調製) を添加する。懸濁の必要はない。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を注意深く除去し廃棄する。ターゲット DNA が結合したビーズに触れないよう注意する。

7. **Step 6** をさらに 1 回繰り返す。2 回目の洗浄後は、液残りがないようにできる限り上清を破棄する。必要に応じてスピンドウンして、マグネット上に戻し、p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
8. マグネットスタンド上に設置した状態で、チューブまたはプレートの蓋を開けて最長 5 分間ビーズを風乾させる。
注) ビーズを過乾燥させないこと。過乾燥により、ターゲット DNA の回収率が低下する可能性がある。目に見える液体はすべて蒸発しているが、ビーズが暗褐色で光沢を有する時点でサンプルを溶出させる。ビーズが淡褐色に変化し亀裂が生じ始めると過乾燥である。
9. チューブまたはプレートをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 17 μ L の 0.1 x TE (1 x TE を純水で 10 倍希釈) を添加してターゲット DNA を溶出する。
10. ボルテックスミキサーまたは 10 回のピペッティングで十分に混合する。室温で 2 分間以上インキュベーションする。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に戻す前に、必要に応じてスピンドウンする。
11. チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に設置する。5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清の 15 μ L を新しい PCR チューブに移して、次のステップに進む。
12. サンプルは -20 $^{\circ}$ C で保存可能。

Protocol: PCR Enrichment of Adaptor-ligated DNA

1. Adaptor Ligated DNA Fragments に Table 14 の試薬を追加する。

Table 14

COMPONENT	VOLUME
Adaptor Ligated DNA Fragments	15 μ L
(blue) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 μ L
Index Primer/i7 Primer	5 μ L
Universal PCR Primer/i5 Primer	5 μ L
Total Volume	50 μ L

2. 100 μ L または 200 μ L のピペットを 40 μ L にセットし、10 回以上ピペッティングして完全に混合して、スピンドウンする。
3. サーマルサイクラーにチューブをセットし、Table 15 のサイクル条件を用いて PCR を行う。

Table 15

CYCLE STEP	TEMP	TIME	CYCLES
Initial Denaturation	98 $^{\circ}$ C	30 seconds	1
Denaturation	98 $^{\circ}$ C	10 seconds	3-13
Annealing/Extension	65 $^{\circ}$ C	75 seconds	
Final Extension	65 $^{\circ}$ C	5 minutes	1
Hold	4 $^{\circ}$ C	∞	

注) PCR サイクル数は、サンプルのインプット量および種類から、Table 16 にしたがって決定する。また、サンプルが同じであってもインプット DNA の精製方法が異なる場合、PCR サイクル数の再最適化が必要となる場合がある。シーケンスに十分なライブラリ量を確保するためには、十分なサイクル数が必要であるが、サイクル数が過剰な場合、PCR Artifact (Bioanalyzer で高分子側にピークが出現) や PCR バイアス (増幅エラー) が発生するリスクが生じることに注意する。

Table 16

INPUT DNA IN THE FS REACTION	# OF CYCLES REQUIRED FOR STANDARD LIBRARY PREP: YIELD ~100 ng (5–35 nM)
100 ng	3-4
50 ng	4-5
10 ng	6-7
5 ng	7-8
1 ng	8-9
0.5 ng	8-10
0.1 ng	12-13

Protocol: Cleanup of PCR Reaction

1. AMPure XP Beads をボルテックスして懸濁する。30 分以上かけて室温に戻した後、再懸濁をしてから使用する。
2. 懸濁したビーズ 45 μ L (ライゲーション反応液量の 0.9 倍量) を PCR product に添加する。10 回以上ピペティングして十分に混合する。最後のピペティングで、ピペットチップから全ての液体を排出する。3-5 秒間のボルテックスによる混合も可能である。混合後にスピンドウンする場合には、ビーズが沈澱する前に必ず遠心機を停止する。
3. サンプルを静置して、5 分以上、室温でインキュベーションする。
4. チューブまたはプレート適切なマグネットスタンド上に設置し、ビーズを上清から分離する。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に設置する前に、必要に応じてスピンドウンする。
5. 5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清を注意深く除去して廃棄する。ビーズにはターゲット DNA が結合しているため、触れないように注意する (注意: ビーズを廃棄しないこと)。なお、上清には目的サイズより小さい DNA (アダプターを含む) が残っている。
6. マグネットスタンド内にチューブまたはプレートを設置したまま、80 %エタノール 200 μ L (用時調製) を添加する。懸濁の必要はない。室温で 30 秒間インキュベーションし、上清を注意深く除去し廃棄する。ターゲット DNA が結合したビーズに触れないよう注意する。
7. Step 6 をさらに 1 回繰り返す。2 回目の洗浄後は、液残りがないようにできる限り上清を破棄する。必要に応じてスピンドウンして、マグネット上に戻し、p10 ピペットチップで微量のエタノールを除去する。
8. マグネットスタンド上に設置した状態で、チューブまたはプレートの蓋を開けて最長 5 分間ビーズを風乾させる。

注) ビーズを過乾燥させないこと。過乾燥により、ターゲット DNA の回収率が低下する可能性がある。目に見える液体はすべて蒸発しているが、ビーズが暗褐色で光沢を有する時点でサンプルを溶出させる。ビーズが淡褐色に変化し亀裂が生じ始めると過乾燥である。

9. チューブまたはプレートをマグネットスタンドから取り出す。ビーズに 33 μL の 0.1 x TE (1 x TE を純水で 10 倍希釈) を添加してターゲット DNA を溶出する。
10. 10 回のピペティングまたはボルテックスで十分に混合する。室温で 2 分間以上インキュベーションする。チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に戻す前に、必要に応じてスピンドウンする。
11. チューブまたはプレートをマグネットスタンド上に設置する。5 分後 (または溶液が透明になったら)、上清の 30 μL を新しい PCR チューブに移す。これがイルミナシーケンサー用ライブラリである。
12. Tape Station 等を用いて電気泳動を実施し、ライブラリの濃度および断片長を確認する。

注) ライブラリは、断片化 DNA のサイズに 120 bp を加えたサイズを中心とした分布を示すはずである。ライブラリの長さの増加は、DNA 断片へのアダプターとプライマーの追加を反映している。

注) 目的ピーク以外に ~80 bp (プライマー) や 128 bp (アダプターダイマー) のピークが観察された場合、再精製してこれらを除去することを推奨する (フローセルに結合するため)。0.1 x TE Buffer を使用してライブラリ容量を 50 μL にして、懸濁したビーズ 40 μL (ライブラリの 0.8 倍量) を添加し、Cleanup of PCR Reaction を行う。インプット量が 1 ng 未満であった場合に、アダプターダイマーを生じることがある。
13. 必要に応じて定量 PCR ベースの方法 (Kapa Library Quantification Kit, QIAseq Library Quant Assay Kit 等を使用)、またはそれに準ずる方法を使用してライブラリの定量を実施する (通常、PCR 増幅後のライブラリの場合 TapeStation 等での定量で十分であり、定量 PCR は必須ではない)。
14. 精製したライブラリは、シーケンシングに使用する準備ができるまで、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存する。

○SOP 4：メタゲノムシーケンシング

・目的

- ー マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームからの DNA 抽出をショットガンシーケンシングする際のシーケンシングの手順について定める。

・SOP の利用者

- ー 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため皮膚のマイクロバイオームから DNA をショットガンシーケンシングしたい研究者・技術者
- ー 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ー ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格	備考
Illumina NextSeq 500/550	-	1 unit		
Illumina NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 cycles)	20024905	1 kit	347,900 円	約 1.3 億クラスターを生成
Illumina NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 cycles)	20024908	1 kit	908,400 円	約 4 億クラスターを生成

・SOP

1. ヒト皮膚のマイクロバイオームサンプル 1 つにつき約 1000-2000 万リードペアを得ることを目安にすることを推奨する。このシーケンスリードでの微生物由来メタゲノムの情報量はヒトゲノム DNA の混入率により変動するが、通常のプロファイリング用途では上記リードから 400 万リードペア程度以上を保持することを目安とすることを推奨する。実験目的等に応じて適切なシーケンシング深度を設定することが望ましい。
2. 基本的に Illumina の推奨プロトコルでシーケンシングを実施する（プロトコルの推奨の通り、Illumina NextSeq 500/550 の場合 Cluster Density は 170-220 K/mm² を目安に調製）。
注）2 色法 SBS ケミストリーを採用しているシーケンサー（NextSeq, NovaSeq）を低プレックス数でランする際は、インデックスに利用するバーコードの最初の 2 塩基が GG であるもの（GGACTCCT など）に偏らないよう注意する。
3. Q30 と%PF（passing filter）を確認する（全体の塩基の中で Q30 以上の塩基が 75 %以上であり、%PF が 80 %以上であることを目安に）。

○SOP 5 : データ QC

・目的

- ー マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームからの DNA 抽出をショットガンシーケンシングする際のリードデータ QC の手順について定める。

・SOP の利用者

- ー 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため皮膚のマイクロバイオームから DNA をショットガンシーケンシングしリードデータを解析したい研究者・技術者
- ー 基本的なバイオインフォマティクスの知識、基本的な Linux などのコマンドライン操作に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ー ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・SOP

1. FastQC でリードデータの塩基ごとの Phred score の分布等を確認。
2. fastp でデータ中の不要な情報を削除する（注：アダプター配列は指定しなくても除去は可能、しかし指定した方がより精度の高い除去が可能）。

（NovaSeq データの場合）

```
module load fastp/0.20.0
```

```
fastp
```

```
-i ${in1}
```

```
-l ${in2}
```

```
-o ${out1}
```

```
-O ${out2}
```

```
--adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
```

```
--adapter_sequence_r2=AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
```

```
--trim_front1 0
```

```
--trim_front2 0
```

```
--trim_tail1 0
```

```
--trim_tail2 0
```

```
--cut_right
```

```
--cut_right_window_size 4
```

```
--cut_right_mean_quality 18
```

```
--trim_poly_x
```

```
--poly_x_min_len 10
```

```
--n_base_limit 0
```

```
--low_complexity_filter
```

```
--length_required 75
```

(NextSeq データの場合)

```
module load fastp/0.20.0
```

```
fastp
```

```
-i ${in1}
```

```
-l ${in2}
```

```
-o ${out1}
```

```
-O ${out2}
```

```
--adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
```

```
--adapter_sequence_r2=AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
```

```
--trim_front1 5
```

```
--trim_front2 5
```

```
--trim_tail1 1
```

```
--trim_tail2 1
```

```
--cut_right
```

```
--cut_right_window_size 4
```

```
--cut_right_mean_quality 18
```

```
--trim_poly_x
```

```
--poly_x_min_len 10
```

```
--n_base_limit 0
```

```
--low_complexity_filter
```

```
--length_required 75
```


○SOP 6：ヒト由来 DNA 配列を含むリード情報の削除

・目的

- マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームからの DNA 抽出をショットガンシーケンシングする際のリードデータからホストのヒト由来ゲノム DNA 配列を含むリードを除去する手順について定める。

・SOP の利用者

- 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため皮膚のマイクロバイオームから DNA をショットガンシーケンシングしリードデータを解析したい研究者・技術者
- 基本的なバイオフィォマティクスの知識、基本的な Linux などのコマンドライン操作に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・SOP

1. ヒトゲノム配列情報をダウンロード（NCBI の GRCh38、もしくは東北メディカルメガバンクの JG1.0.0b）し、それらを BMTagger で利用できるようにフォーマットする。
2. BMTagger を利用しヒトゲノム由来と想定されるリード情報を削除する（注：GRCh38、JG1.0.0b のどちらでも除去率は大きく変わらない、特に人種での違いによる除去率の変化も見られない、ただし、それぞれのリファレンス情報のみでしか除去できない配列もあるため、完全な除去を目指す場合、GRCh38 と JG1.0.0b の両方の情報を利用するとより良いと考えられる）。

（実施コマンド例）

```
module load BMTagger/3.101
bmtagger.sh
-b .../NCBI/GRCh38/Sequence/BMTaggerIndex/genome.bitmask
-x .../NCBI/GRCh38/Sequence/BMTaggerIndex/genome.srprism
-q1 -1${in1}
-2${in2}
-o ${out}
-X
```

○補足 SOP : 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析

・目的

- マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームから抽出した DNA からの 16S rRNA 遺伝子アンプリコンライブラリ調製工程の手順について定める。

・SOP の利用者

- 皮膚のマイクロバイオームから抽出された DNA をもとに Illumina シークエンサ (MiSeq を想定) 用のアンプリコン DNA ライブラリを調製したい研究者・技術者
- 皮膚のマイクロバイオーム中の異なる細菌種の DNA から、多様性・正確性に優れた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンライブラリを得たい研究者・技術者
- 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備 (使用機器・試薬等) ※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格	メーカー	備考
illumina MiSeq					
KAPA HiFi HS ReadyMix	KK2601	100 回用	14,300 円	KAPA Biosystems	
	KK2602	500 回用	68,000 円		
AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (Low DNA) with Gold Buffer and MgCl ₂	4338856	250 units	61,800 円	Applied Biosystems	
	4338857	1,000 units	216,400 円		
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	TKR4030	各 3.2 μmol / 1.28 mL	20,000 円	TAKARA	
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円	Beckman Coulter	
	A63881	60 mL	197,000 円		
	A63882	450 mL	948,000 円		
アンプリコンプライマー (Fw, Rv)	-	-	-		
Nextera XT Index Kit v2 Set A Set B Set C Set D	FC-131-2001	96 Indices, 384 Samples	187,200 円	Illumina	
	FC-131-2002				
	FC-131-2003				
	FC-131-2004				
MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles, V4)	MS-102-2003	1 kit	234,900 円	Illumina	
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, V3-V4)	MS-102-3003	1 kit	305,800 円		

・アンプリコンプライマー配列

V1-V2、V4 もしくは V3-V4 領域を標的とした下記アンプリコンプライマーセットのいずれかを用いる。

標的領域	配列
------	----

V1-V2 (27Fmod)	5'- <u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'
V1-V2 (338R)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
V1-V2 (338RII)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCAGCCACCCGTAGGTGT-3'
V1-V2 (338RIII)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCTGCCACCCGTAGGTGT-3'
V3-V4 (341F)	5'- <u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
V3-V4 (806R)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'
V4 (515F)	5'- <u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
V4 (806R)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'

*下線部は Illumina オーバーハングアダプター配列

* V1-V2 領域のリバースプライマーは、338R、338RII、338RIII を等量混合して使用

・ SOP

具体的な実験操作は Illumina の 16S サンプル調製ガイド (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (文書番号:15044223 Rev. B JPN)) に従う。ただし、ヒト皮膚由来サンプルでは、ヒト DNA 由来の非特異的な増幅が見られる場合があり、KAPA HiFi HS ReadyMix の使用が適切ではない場合がある。そのような場合は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持たない Taq ポリメラーゼ等の使用を推奨する。以下に AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼを使用する場合の手順を示す。

ヒト皮膚由来試料では DNA 回収量が少なく、PCR に投入できる DNA 量 (ゲノムコピー数) が極端に少ない場合があることに注意が必要である。一般に、上記方法で皮膚試料から 1 回の DNA 抽出で得られる DNA 量は 10^3 - 10^5 16S rRNA 遺伝子コピー程度 (V1V2 領域を標的とした定量 PCR で評価) であり、PCR のテンプレート DNA はその一部を利用することから、シーケンシングに供される 16S rRNA 遺伝子コピー数はシーケンシング時のリード数よりも下回ることがある。その場合、16S rRNA 遺伝子のサンプリング数はシーケンシングリード数ではなく、PCR のテンプレート DNA 中の 16S rRNA 遺伝子コピー数となる。α 多様性の比較等、単純にシーケンシングリード数で正規化することが不適切である場合を考慮すべきである。PCR に投入する DNA 量は可能な限り (PCR の障害がない範囲で) 多くすることを推奨する。また、定量 PCR を用いた原核生物ゲノム量、真菌等微生物ゲノム量の定量、または spike-in (人工) 配列 DNA を用いた方法によって DNA 投入レベルの評価をし、その後の解析に反映することが望ましい (補足 SOP : spike-in (人工) 配列 DNA を用いた精度管理を参照)

アンプリコン PCR

1. Table 17 のようにサンプル DNA と試薬類を調製する。

Table 17

COMPONENT	VOLUME
DNA	1.3 μL
F-primer (10 μM)	1.3 μL
R-primer (10 μM)	1.3 μL
dNTP (2.5 mM each)	2.0 μL
25 mM MgCl ₂	1.5 μL

10x Gold buffer	2.5 μ L
AmpliTaq Gold, LD	0.1 μ L
Pure water	15.0 μ L
Total Volume	25.0 μ L

2. Table 18 のサイクル条件を用いてサーマルサイクラーで PCR を行う。

Table 18

Temperature	Time	Number of cycles
95 °C	10 min	1
95 °C	45 s	25-35
50 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
12 °C	∞	Hold

3. 2%アガロースゲル電気泳動等を実施し、目的のサイズの DNA が得られているか確認する。
以降の実験操作は Illumina の 16S サンプル調製ガイドに従う。

○補足 SOP：真菌の ITS、LSU rRNA 遺伝子アンプリコン解析

・目的

- マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームから抽出した真菌の DNA から LSU rRNA 遺伝子または SSU rRNA 遺伝子、スペーサー領域のアンプリコンライブラリ調製工程の手順について定める。

・SOP の利用者

- 皮膚のマイクロバイオームから抽出された DNA をもとに Illumina シークエンサ (MiSeq を想定) 用のアンプリコン DNA ライブラリを調製したい研究者・技術者
- 皮膚のマイクロバイオーム中の異なる細菌種の DNA から、真菌の多様性・正確性に優れた rRNA 遺伝子アンプリコンライブラリを得たい研究者・技術者
- 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備 (使用機器・試薬等) ※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格	メーカー	備考
illumina MiSeq					
KAPA HiFi HS ReadyMix	KK2601	100 回用	14,300 円	KAPA Biosystems	
	KK2602	500 回用	68,000 円		
AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (Low DNA) with Gold Buffer and MgCl ₂	4338856	250 units	61,800 円	Applied Biosystems	
	4338857	1,000 units	216,400 円		
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	TKR4030	各 3.2 μmol / 1.28 mL	20,000 円	TAKARA	
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円	Beckman Coulter	
	A63881	60 mL	197,000 円		
	A63882	450 mL	948,000 円		
アンプリコンプライマー (Fw, Rv)	-	-	-		
Nextera XT Index Kit v2 Set A Set B Set C Set D	FC-131-2001	96 Indices, 384 Samples	187,200 円	Illumina	
	FC-131-2002				
	FC-131-2003				
	FC-131-2004				
MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles, V4)	MS-102-2003	1 kit	234,900 円	Illumina	
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, V3-V4)	MS-102-3003	1 kit	305,800 円		

・アンプリコンプライマー配列

標的領域を選択して下記アンプリコンプライマーセットを用いる。

標的領域	配列

D1-D2 (LR0f)	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCCGCTGAACCTAAGC-3'
D1-D2 (LR3r)	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCCGTGTTTCAAGACGG</u> -3'
V9 forward	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTACACACCCGCCCGTC-3'
V9 reverse	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> TGATCCTTCYGCAGGTTACCTAC-3'
ITS1 forward	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTGRTCATTTAGAGGAASTAA-3'
ITS1 reverse	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCTGCGTTCTTCATCGWTGY-3'
ITS2 forward	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGRCAWCGATGAAGAACGCAGC-3'
ITS2 reverse	5'- <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

*下線部は Illumina オーバーハングアダプター配列

・ SOP

具体的な実験操作は Illumina の 16S サンプル調製ガイド (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (文書番号:15044223 Rev. B JPN)) に従う。D1D2 プライマーセットを使用する場合、1st PCR のアニーリング温度は 57 °C に設定する。期待されるサイズの PCR 産物が得られない場合や、PCR 産物が多く非特異的な増幅が多い場合は、適切な PCR サイクル数で PCR を実施することが望ましい。

D1-D2 の PCR では、2nd PCR 後の最終ライブラリ産物に 150-200 bp 付近のダイマー様の非特異的な産物が見られることがある。その場合は、2nd PCR 後の精製を複数回実施することで非特異的な産物を除去できることがある。2nd PCR 後の精製に使用する AMPure XP ビーズのインプット量を減らす (2nd PCR product の 0.7 倍量等) などの対策を行うことで、上記非特異的産物の除去を効率的に実施することも有効である場合がある。

ヒト皮膚由来サンプルでは、上記 PCR を実施する際、ヒト DNA 由来の非特異的な増幅が見られる場合があり、KAPA HiFi HS ReadyMix の使用が適切ではない場合がある。そのような場合は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持たない Taq ポリメラーゼ等の使用を推奨する。その場合、16S rRNA 遺伝子の増幅では V4 領域を増幅するプライマーでは増幅できない。以下に AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼを使用する場合の手順を示す。

本計測においても、上述した通りヒト皮膚由来試料では DNA 回収量が少なく、PCR に投入できる DNA 量 (ゲノムコピー数) が極端に少ない場合があることに注意が必要である。

アンプリコン PCR

1. Table 19 のようにサンプル DNA と試薬類を調製する。

Table 19

COMPONENT	VOLUME
DNA	1.3 µL
F-primer (10 µM)	1.3 µL
R-primer (10 µM)	1.3 µL
dNTP (2.5 mM each)	2.0 µL
25 mM MgCl ₂	1.5 µL
10x Gold buffer	2.5 µL

AmpliTaq Gold, LD	0.1 μ L
Pure water	15.0 μ L
Total Volume	25.0 μ L

2. Table 20 のサイクル条件を用いてサーマルサイクラーで PCR を行う。

Table 20

Temperature	Time	Number of cycles
95 °C	10 min	1
95 °C	45 s	25-40
50 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
12 °C	∞	Hold

3. 2%アガロースゲル電気泳動等を実施し、目的のサイズの DNA が得られているか確認する。
以降の実験操作は Illumina の 16S サンプル調製ガイドに従う。

○補足 SOP：モック標品を用いた精度管理

・目的

- ― 皮膚からのマイクロバイオーーム採取と DNA 抽出の精度管理を目的に、モック標品（NBRC ヒト常在微生物カクテル）の使用について定める。

・SOP の利用者

- ― モック標品を用いて、皮膚からのマイクロバイオーーム採取と抽出の精度を管理したい研究者・技術者
- ― 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格
NBRC ヒト常在菌体カクテル※ ¹	Cell-Mock-003	500 μ L x 1 本	21,340 円

PBS (pH 7.4)、グリセロール

・SOP（菌体モック標品）

DNA 抽出 (SOP 2)、モデル皮膚を用いた精度管理（補足 SOP）の検証に使用する。

1. 菌体モック標品の細胞濃度をデータシート（製品に付属、<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/cocktail20220113.html> を参照）により確認し、1 サンプルあたり 1.0×10^7 cells 使用する。

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

品名	Code No.	単位	価格
NBRC ヒト常在菌 DNA カクテル※ ²	DNA-Mock-003	30 μ L x 1 本	34,980 円
クロンテック Human Genomic DNA	CLN 636401	100 μ g x 1 本	68,000 円

・SOP（DNA モック標品とヒト DNA）

ヒト DNA 除去法及びライブラリ調製法の検証に使用する。

1. DNA モック標品及びヒト DNA の DNA 濃度を Qubit® dsDNA HS Assay Kit 等を用いて測定する。
2. 下記の 2 種類の濃度の混合液を作成する。
 - ① サンプルあたり 0.1 ng DNA モック標品、0.9 ng ヒト DNA を混合し、純水を加えて 20 μ L にする。
 - ② サンプルあたり 10 ng DNA モック標品、90 ng ヒト DNA を混合し、純水を加えて 20 μ L にする。

※1：真菌の細胞を含んでいません。

※2：真菌のゲノム DNA を含んでいません。

注：真菌の細胞またはゲノム DNA を含むモック標品は現在 NITE にて開発中で、近日中の提供に向けて準備中です。

○補足 SOP : spike-in (人工) 配列 DNA を用いた精度管理

・目的

- マイクロバイオーム関連計測データの信頼性確保、比較互換性の担保を目的に、皮膚のマイクロバイオームから抽出した DNA からの rRNA 遺伝子アンプリコンライブラリ調製工程での spike-in コントロールの使用手順について定める。

・SOP の利用者

- 皮膚マイクロバイオーム中の細菌の絶対定量、真菌の絶対定量と共に、細菌と真菌の存在比に関する情報を得たい研究者・技術者
- 皮膚マイクロバイオームから rRNA 遺伝子アンプリコン解析を実施する際、毎回の調製毎の精確性等の評価、精度管理を実施したい研究者・技術者
- 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・前提条件

- ヒト皮膚のマイクロバイオームを対象とする場合、関連機関の倫理委員会等において本プロトコルの利用が承認されていること

・準備 (使用機器・試薬等)

16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析 (補足 SOP) を下記表の spike-in コントロールを用いて精度管理する。

Identifier	GenBank accession number	Reference 16S rRNA gene sequence (GenBank accession number)	Length spike-in (bp)	Linearize
Ec5001	LC140931	<i>E. coli</i> (X80725, AF233451)	1525	Bpm I
Ec5003	LC140933	<i>E. coli</i> (X80725, AF233451)	1525	Bsa I
Bv5501	LC140939	<i>B. vulgatus</i> (NR 112946)	1520	Bsa I
Ca5501	LC140940	<i>C. acetobutylicum</i> (X78070)	1495	Bsa I

真菌の ITS、LSU rRNA 遺伝子アンプリコン解析 (補足 SOP) を下記表の spike-in コントロールを用いて精度管理する。

Identifier	Reference SSU-ITS-LSU rRNA gene sequence, species (GenBank accession number)	Length spike-in (bp)	Linearize
Cn5001	<i>C. neoformans</i> (NC_026746)	1320	Bsa I
Cn5002	<i>C. neoformans</i> (NC_026746)	1320	Bsa I
Sc5003	<i>S. cerevisiae</i>	1596	Bpm I

	(NC_001144)		
Sc5004	<i>S. cerevisiae</i> (NC_001144)	1596	Bsa I
Sc5005	<i>S. cerevisiae</i> (NC_001144)	1596	Bsa I
Sc5006	<i>S. cerevisiae</i> (NC_001144)	1596	Bsa I

・ SOP

1. DNA 抽出方法 SOP (SOP 2) に従って抽出した DNA 溶液の 16S rRNA 遺伝子または ITS、LSU rRNA 領域遺伝子のおおよそのコピー数を推定する。
2. DNA 溶液のコピー数に対して約 10%の spike-in コントロールのコピー数が添加されるように spike-in コントロールを調製する。
3. 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析 (補足 SOP) または真菌の ITS、LSU rRNA 遺伝子アンプリコン解析 (補足 SOP) に従ってアンプリコンライブラリを調製する。

○補足 SOP：皮膚を模擬したモデル表皮材料による微生物細胞回収に係る精度管理

・目的

- 一 皮膚からのマイクロバイーム採取と DNA 抽出の精度管理を目的に、ウレタン素材のバイオスキンプレートに菌体モック標品を塗布してモデル皮膚として採取、抽出する手順について定める。

・SOP の利用者

- 一 バイオスキンプレートと菌体モック標品を用いて、皮膚からのマイクロバイーム採取と抽出の精度管理、方法の評価を実施したい研究者・技術者
- 一 基本的な分子生物学の知識、基本的な分子生物学実験に習熟した研究者・技術者

・準備（使用機器・試薬等）※価格等は 2024 年 12 月時点のものです。

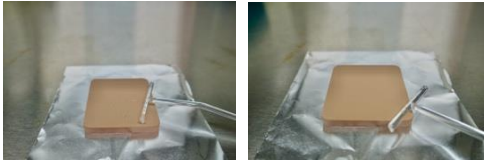

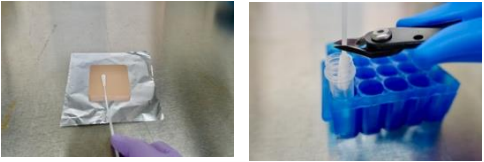
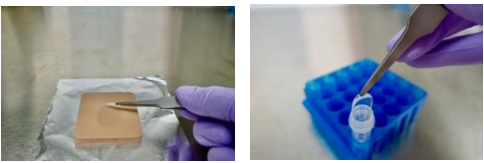
品名	Code No.	単位	価格
Beulax バイオスキンプレート（50 mm 角）ウレタン	No.64	1 枚	3,350 円
NBRC ヒト常在菌菌体カクテル※1	Cell-Mock-003	500 μ L x 1 本	21,340 円
ケニス株式会社ディスココンラージ棒	1-318-0058	100 本	1,683 円

PBS (pH 7.4)

・SOP

1. 雑菌によるコンタミネーション防止と作業環境安定のため、安全キャビネット内で作業する。バイオスキンプレートの菌体塗布面（肌のような凹凸のある面）を 1 時間紫外線滅菌する。
2. 菌体モック標品の細胞濃度をデータシート（製品に付属、<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/cocktail20220113.html> を参照）により確認し、 2.5×10^7 cells / 50 μ L（PBS）に調製し、菌液とする。
注）単位面積あたりに塗布したい菌体数に合わせて菌液を調製する。
3. 転倒混和で均一にした菌液 50 μ L を、バイオスキンへ塗布面の複数箇所に分けて滴下する。
4. 滅菌済のコンラージ棒でバイオスキンの塗布面全体へ均一に塗り広げる。菌液の偏りが目視で確認できなくなるまで（水滴が目視で確認できなくなるまで）、コンラージ棒で丁寧に菌液の偏りを塗り広げる。
5. 5 分間乾燥させる（時間厳守、時間経過により乾燥度が変化することに注意）。
6. 以降の実験操作は皮膚からのマイクロバイーム採取（SOP 1）と DNA 抽出（SOP 2）に従う。

手順	写真
3	

4	
5	
6 スワブ	
6 テープ	

※1：真菌の細胞を含んでいません。

注：真菌の細胞を含むモック標品は現在 NITE にて開発中で、近日中の提供に向けて準備中です。

著者：馬上麻美（産総研）、石山静葉（産総研）、Dieter Toulousse（産総研）、関口勇地（産総研）

© JMBC

改定履歴

SOP ver.	改定日	改訂事由
Ver.1	2022.4.28	分析 SOP 第1版 初版
Ver.1.1	2024.11.10	分析 SOP 第1版 1.1版
Ver.1.2	2025.1.27	分析 SOP 第1版 1.2版