

○背景

日本マイクロバイオー姆コンソーシアム（JMBC）は、糞便等ヒト試料に関するマイクロバイオー姆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）、理化学研究所（理研）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。

- マイクロバイオー姆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オー姆研究や今後実施されるヒトマイクロバイオー姆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オー姆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精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、計測の精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、マイクロバイオー姆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、糞便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

● DNA 抽出	2
● DNA ライブラリ調製	5
● メタゲノムシーケンシング	17
● データ QC	18
● ヒト由来 DNA 配列を含むリード情報の削除	20
● 補足：16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析	21
● 補足：モック標品を用いた精度管理	22

○SOP 1 : DNA 抽出

・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、糞便からの DNA 抽出工程の手順について定める。
- 糞便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、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

- 比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため糞便から DNA を得たい研究者・技術者
- 糞便中の異なる細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

- ヒト糞便を対象とする場合、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

ISOSPIN Fecal DNA

構成成分	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）

・ SOP

1. 滅菌スパチュラ等を用いて **Beads Tube** に **0.2 g-wt** 程度の糞便試料を添加する（添加前後の **Tube** を秤量し、添加した糞便試料の重量を把握することが望ましい）。
2. **700 μ L** の **FE 1 Buffer** を **Beads Tube** に添加する。
注) FE1 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。
3. **10 μ L** の **RNase A** を **Beads Tube** に添加する。
4. **FastPrep-24** にスクリュ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 \times g**, **15 分**間）を実施する。
7. 上清 **500 μ L** を新しい **1.5 mL** マイクロチューブに移す。
注) 糞便サンプルの水分含量が少ない場合、**500 μ L** の上清を回収できない場合がある。その場合は、**Step 8** で添加する試薬の液量比を維持してスケールダウンする。なお、**Step 9** 以降は量比を変更する必要はない。
8. **200 μ L** の **FB Buffer** と **200 μ L** のイソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合する。
注) **FB Buffer** とイソプロパノールの添加量は、上清の液量に対して **0.4 倍量**（上清が **400 μ L** の場合、**FB Buffer** とイソプロパノールは各 **160 μ L** 添加）。
9. **Step 8** の混合液を全量 **Spin Column** に添加し、遠心分離（**13,000 \times g**, **30 秒**間）する。
10. **Spin Column** のカラムを外し、**Collection Tube** の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 \times g**, **1 分**間）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 \times g**, **1 分**間）後、**Step 10** と同じ作業を行う。
注) メンブレンに着色が残っている場合、**11-12** を再度行った後、着色の有無によらず次の工程へ進む。
13. ピペットマンを用いて濾液を捨て、空の **Spin Column** を再度遠心（**13,000 \times g**, **1 分**間）し、残った **FW Buffer** を完全にスピンドアウンする。
14. ピペットマンを用いて濾液を捨て、**Spin Column** を新しい **1.5 ml** マイクロチューブの上ののせる。
15. **50 μ L** または **100 μ L** の **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) 高い DNA 濃度を求める場合は、50 μ L の TE (pH 8.0) で溶出することを推奨。

16. 遠心 (13,000 \times g, 1 分間) 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。
19. 1%アガロースゲル電気泳動を実施し、DNA サンプルの DNA 分子量を確認する。

○SOP 2 : 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、糞便から抽出した 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糞便から抽出された 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
- 糞便中の異なる細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

- ヒト糞便を対象とする場合、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。

1) コバリスを利用し SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Kit を利用する場合

- ・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	メーカー
SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Kit	R400674	24 回	139,000 円	タカラバイオ
	R400675	48 回	262,000 円	タカラバイオ
	R400676	96 回	483,000 円	タカラバイオ
	R400677	480 回(96 回 × 5)	2,131,000 円	タカラバイオ
Unique Dual Index Kit (1-96, 97-192, 193-288, 289-384)	634752	96 回	96,000 円	タカラバイオ
	634753	96 回	96,000 円	タカラバイオ
	634754	96 回	96,000 円	タカラバイオ
	634755	96 回	96,000 円	タカラバイオ
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880	5 mL	53,000 円	Beckman Coulter
	A63881	60 mL	197,000 円	Beckman Coulter
DNA Shearing System M220				Covaris
microTUBE Snap-Cap	520045	25 本入り	44,000 円	Covaris
Low-EDTA-TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)	12090-015	100 mL	10,700 円	Thermo Fisher Scientific

SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Kit

構成	Cap color	保存	R400674	R400675	R400676	R400677
構成	Cap color	保存	R400674	R400675	R400676	R400677

			(24 回)	(48 回)	(96 回)	(480 回)
Template Preparation D Buffer	Red	-20° C	50 µL	105 µL	205 µL	5 × 205 µL
Template Preparation D Enzyme	Red	-20° C	25 µL	50 µL	105 µL	5 × 105 µL
Library Synthesis D Buffer	Yellow	-20° C	25 µL	50 µL	105 µL	5 × 105 µL
Library Synthesis D Enzyme	Yellow	-20° C	25 µL	50 µL	105 µL	5 × 105 µL
Library Amplification D Buffer	Green	-20° C	630 µL	1260 µL	2 × 1275 µL	10 × 1275 µL
Library Amplification Enzyme	Green	-20° C	25µL	50µL	105µL	5 × 105µL
Nuclease-Free Water	Clear	-20° C	500µL	500µL	500µL	5 × 500µL

・ SOP

Protocol: fragmentation with Covaris

1. ライブラリ調製に必要な濃度 (0.1-1 µg/50 µL 程度) に調製した DNA 溶液 50 µL を microTUBE Snap-Cap に入れる。

注) Covaris を用いた断片化による DNA の回収率は 50-60% (サイズセレクションを実施する場合 10~20%) 程度と想定されるため、サンプル量や実験目的に応じてインプット DNA 量を設定する。糞便試料から抽出した DNA など十分量得られている場合は 1 µg 以上のインプットを推奨。

2. インサートサイズが 350 bp になるように、次の条件でセッティングする。Duty Factor 20 %、Peak/Displayed Power 50 W、Cycle/Burst 200、Duration 65 seconds、Temperature 20°C。

注) Covaris LE220 を利用する場合は 96 microTUBEs plate (P/N 520078) を利用し、Duty Cycle 15%、PIP 450、Cycles per Burst 200、Time 30 s、Temp. 7°C で実施すると同程度の処理となる。

3. チューブの底に空気が入っていないことを確認し、装置にセットする。断片化をスタートする。

4. 断片化後、必要に応じて PCR チューブ用の卓上遠心機で軽くスピンドウンし、サンプルをチューブの底に集める。

5. 断片化後の DNA 溶液 50 µL を新しいチューブに移し、AMPure XP を 90 µL 加えて精製を行う。以降のステップで必要となる容量 (20-50 µL 程度、Covaris への DNA インプット量に応じて調節) の Low-EDTA-TE で溶出する。

注) 通常の TE でも問題なくライブラリ調製は可能だが定量性等の評価は未実施であり保証しない。

必要に応じてサイズセレクションを行う。

6. Qubit® dsDNA HS Assay 等で断片化後 DNA の濃度を確認する。

Protocol: SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Library Preparation

Protocol: Template Preparation Step

1. Table 1 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 101-105°C に設定する。

Table 1. Template Preparation Reaction

Step	Incubation temperature	Incubation time
1	22°C	25 min
2	55°C	20 min
3	4°C	Hold (≦2 hr)

2. 断片化後の DNA 溶液を Low-EDTA-TE で希釈して必要なインプット濃度 (50 pg-50 ng/10 μL) に調製し、これを PCR チューブに 10 μL 移す。
注) 断片化後 DNA が十分量得られている場合、最大インプット量 (50 ng) を推奨。
3. Table 2 に従って新しいチューブに Template Preparation Master Mix を調製する。十分にピペッティングする。使用するまで氷上に置いておく。
注) 操作中の試薬のロスを考慮し、試薬量を 5% 多めに準備する。自動化装置を使用する場合、試薬量を 15% + 20 μL 程度多めに準備する。

Table 2. Template Preparation D Master Mix

Component	Cap Color	Volume (μL)
Template Preparation D Buffer	Red	2
Template Preparation D Enzyme	Red	1
Total Volume		3

4. 氷上の PCR プレートまたはチューブに DNA サンプル 10 μL を分注し、Step 3 で調製した溶液を添加 (液量合計 13 μL) する。その後十分にピペッティングする。このとき泡がサンプルに入らないように注意する。
5. プレートにしっかりとシールをする。チューブの場合はキャップがしっかりと締まっていることを確認する。
6. スピンドアウンを行い、サンプルが PCR プレートまたはチューブの底にあることを確認する。
7. PCR プレートまたはチューブをサーマルサイクラーにセットし、サーマルサイクラープログラムを実行する。
8. 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スピンドアウンを行う。

Protocol: Library Synthesis Step

1. Table 3 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 101-105° C に設定する。

Table 3. Library Synthesis Reaction

Step	Incubation temperature	Incubation time
1	22° C	40 min
2	4° C	Hold (≦ 30 min)

- Table 4 に従って新しいチューブに Library Synthesis D Master Mix を氷上で調製する。十分にピペティングする。使用するまで氷上に置いておく。

注) 操作中の試薬のロスを考慮し、試薬量を 5% 多めに準備する。自動化装置を使用する場合、試薬量を 15% + 20 μ L 程度多めに準備する。

Table 4. Library Synthesis D Master Mix

Component	Cap Color	Volume (μ L)
Library Synthesis D Buffer	Yellow	1
Library Synthesis D Enzyme	Yellow	1
Total Volume		2

- サンプル 13 μ L に Library Synthesis D Master Mix 2 μ L を添加 (液量合計 15 μ L) し、十分にピペティングする。
- プレートにしっかりとシールをする。チューブの場合はキャップがしっかりと締まっていることを確認する。軽くスピンドウンを行い、サンプルが PCR プレートまたはチューブの底にあることを確認する。
- PCR プレートまたはチューブをサーマルサイクラーにセットし、サーマルサイクラープログラムを実行する。
- 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スピンドウンを行う。

Protocol: Library Amplification Step

- Table 5 に従って、サーマルサイクラーをプログラムする。Library Amplification ステップ (Table 5, Stage 5) の PCR サイクル数は、Table 6 を参考にしてインプット DNA 量に応じて選択する。

注) できるだけ少ないサイクル数 (50 ng インプットの場合は 6 cycles) を推奨。

Table 5. Library Amplification Reaction

	Stage	Temperature	Time	Cycles
Extension & Cleavage	1	72° C	3 min	1
	2	85° C	2 min	1
Denaturation	3	98° C	2 min	1
Addition of Indexes	4	98° C	20 sec	4
		67° C	20 sec	
		72° C	40 sec	
Library Amplification	5	98° C	20 sec	6 (50 ng input DNA)

		72° C	50 sec	11 (1 ng input DNA) (see Table 5)
	6	4° C	Hold	1

Table 6. Stage 5 Amplification Guide

Input DNA	Number of cycles required to generate 300-700 ng library
50 ng	6-8
20 ng	7-8
10 ng	7-8
5 ng	7-9
2 ng	8-10
1 ng	11-12
0.2 ng	14-15
0.05 ng	15-16

2. Table 7 に従って、新しいチューブに Library Amplification D Master Mix を氷上で調製する。十分にピペティングする。使用するまで氷上に置いておく。

注) 操作中の試薬のロスを考慮し、試薬量を 5% 多めに準備する。自動化装置を使用する場合、試薬量を 15% + 20 μ L 程度多めに準備する。

Table 7. Library Amplification D Master Mix

Component	Cap Color	Volume (μ L)
Library Amplification D Buffer	Green	25
Library Amplification Enzyme	Green	1
Nuclease-Free Water	Clear	4
Total Volume		30

3. Table 8 に従って、Library Synthesis Reaction Product に Library Amplification D Master Mix 、 Indexing reagent を加える。その後、十分にピペティングする。このとき泡がサンプルに入らないように注意する。

Table 8. Library Amplification Reaction Mix

Component	Volume (μ L)
Library Synthesis Reaction Product	15
Library Amplification Master Mix	30
Indexing reagent	5
Total Volume	50

4. プレートにしっかりとシールをする。チューブの場合はキャップがしっかりと締まっていること

を確認する。軽くスピンドウンを行い、サンプルが PCR プレートまたはチューブの底にあることを確認する。

- 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実行する。
- 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スピンドウンを行う。

Protocol: Library Purification by AMPure XP beads

- サンプル 50 µL に Agencourt®AMPure®XP Beads を 50 µL 添加し、十分にピペッティングを行う。
- 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 分間静置してビーズをペレット化する。その後、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が対流するようにゆっくりとピペッティングする。
- 200 µL の 80%エタノールを加え、30 秒間インキュベートした後、80%エタノールを除去する。この操作をもう一度行う。
- チューブの蓋を開け、マグネットスタンド上で 2-5 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ない。
- チューブに Low-EDTA-TE を 52.5 µL 加え十分にピペッティングし、DNA を溶出させる。室温で 2 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。
- 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。必要に応じて qPCR (Kapa Library Quantification Kit, Takara Library Quantification Kit 等を使用) を実施しライブラリの濃度を確認する (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、qPCR は必須ではない)。
- ライブラリ溶液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) 酵素法で DNA を切断するため QIAseq FX DNA Library Kit を利用する場合

・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
QIAseq FX DNA Library Kit (24)	180473	24 反応分	122,000 円
QIAseq FX DNA Library Kit (96)	180475	96 反応分	446,000 円
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880, A63881	5 mL, 60 mL	53,000 円, 197,000 円

QIAseq FX DNA Library CDI Kit (24)

構成成分	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 (20µL)	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 qPCR 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 9 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 9. Step 2) は、Table 10 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 9. 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 10. 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 12) 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 11、10 ng 以下の場合は Table 12 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。穏やかにピペッ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 11. 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 12. 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、ピペッ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アウンし、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。
6. 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。

7. 直ちに **Protocol: Adapter Ligation** の工程に進む。

Protocol: Adapter Ligation

1. 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 13 に従ってアダプターを希釈する。

Table 13. Adapter dilution factors

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

2. 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。

3. 氷上で新しい PCR プレートまたはチューブに Table 14 に従って **Ligation master mix** を調製する。ピペティングしてよく混ぜる。

Table 14. Ligation master mix setup (per sample)

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

4. 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 μ L (サンプル液量の 0.8 倍量) の懸濁した Agencourt®AMPure® XP Beads を Ligation reaction product 100 μ L に添加し、ピペティングしてよく混ぜる。
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が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. 200 μ L の 80%エタノールを加えてビーズを洗浄する。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 μ L 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 μ L を新しいチューブに回収する。
6. Step 5 で回収した上清 50 μ L に Agencourt®AMPure®XP Beads を 50 μ L 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 μ L の EB Buffer または 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 μ L 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°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、qPCR (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°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 15 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°C に設定する。PCR サイクル数は、Table 16 を参考に DNA インプット量に応じて設定する。

Table 15. Library amplification cycling conditions

Time	Temperature	Number of cycles
2 min	98°C	1
20 s	98°C	6-12 (see Table 16)
30 s	60°C	
30 s	72°C	
1 min	72°C	1
∞	4°C	Hold

Table 16. Guideline for PCR cycles

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

2. Table 17 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 17. 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

3. 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。
4. サーマルサイクラープログラムが完了したら、懸濁した Agencourt®AMPure®XP Beads 50 μL を各 Library amplification reaction product (50 μL) に加え、十分にピペティングを行う。
5. 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。
6. 200 μL の 80% エタノールを加えてビーズを洗浄する。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。
7. 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。
8. 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。
9. 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。

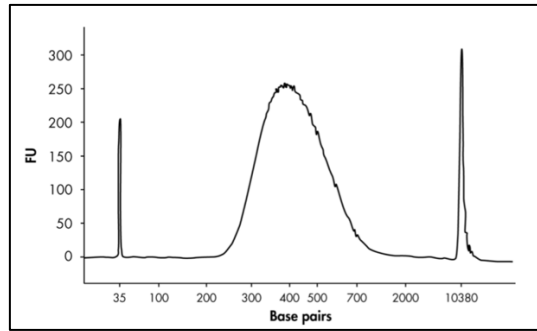


Figure 1 Capillary electrophoresis device trace data

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

10. 必要に応じて qPCR 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、qPCR 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。

○SOP 3：メタゲノムシーケンシング

・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、糞便からの 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

- JMBC コアデータとの比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため糞便から DNA をショットガンシーケンシングしたい研究者・技術者
- 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

- ヒト糞便を対象とする場合、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. ヒト糞便サンプル 1 つにつき約 2,000 万リードペアを得ることを目安に、ライブラリサンプルを調製、混合する（このシーケンスリードでおよそ 90% のメタゲノム情報をカバーできると推定）。
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 4 : データ QC

・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、糞便からの 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

- JMBC コアデータとの比較互換性を確保したメタゲノム情報等を得るため糞便から 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

- ヒト糞便を対象とする場合、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 5：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、糞便からの 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糞便から 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

- ヒト糞便を対象とする場合、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、糞便から抽出した 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

- 糞便から抽出された 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
- 糞便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

- ヒト糞便を対象とする場合、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
KAPA HiFi HS ReadyMix	KK2601	100 回用	14,300 円	KAPA Biosystems	
	KK2602	500 回用	68,000 円		
Agencourt® AMPure® XP Beads	A63880,	5 mL	53,000 円	Beckman Coulter	
	A63881	60 mL	197,000 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

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
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

・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。

○補足 SOP：モック標品を用いた精度管理

・目的

- 糞便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、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、糞便からのマイクロバイ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	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 抽出法及びライブラリ調製法の検証に使用する。

1. 菌体モック標品の細胞数をデータシート (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 4.0×10^9 cells 使用する。

※SOP に従って 4.0×10^9 cells の菌体モック標品から DNA を抽出すると、5 μ g 程度の DNA が得られる。

・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	DNA-Mock-003	30 μ L x 1 本	34,980 円

・SOP (DNA モック標品)

ライブラリ調製法の検証に使用する。

1. DNA モック標品の DNA 濃度を Qubit® dsDNA HS Assay Kit 等を用いて測定する。
2. ライブラリ調製に必要な濃度 (0.1-1 μ g/50 μ L 程度) になるように DNA モック標品に純水を加えて調製する。

著者：成田興司 (JMBC)、Dieter Turlousse (産総研)、関口勇地 (産総研)

© JMBC

SOP ver.	改定日	改訂事由
Ver.1	2019.6.28	分析 SOP 第 1 版 初版
Ver.2	2020.4.20	室間共同試験参加機関からの意見等を反映
Ver.2.1	2020.6.30	データ解析部分の SOP を補足
Ver.2.2	2025.1.27	Covaris 設定見直し、ライブラリ調整キットのプロトコル微調整等