

User Manual (日本語版)



Version 1.5 – UMWT3500

Evercode™ WT Mega v3

For use with

ECWT3500

ECWT3501

法的通知

本書およびその内容は Parse Biosciences, Inc. (以下「Parse Biosciences」) の専有財産であり、ここに記載された製品の使用に関する同社の顧客が使用する目的のみに限定されています。それ以外の目的での使用は認められていません。これらの製品は研究目的に限って使用可能であり、人間または動物に対する診断または治療目的での使用はできません。本書およびその内容は、その他の目的で使用、配布、またはいかなる方法であれ伝達、開示、複製することは、Parse Biosciences の事前の書面による承諾がない限り、認められません。

本書により、Parse Biosciences のいかなる知的財産権についても権利が付与されるものではありません。本書に記載された製品の使用に関するライセンスは、Parse Biosciences と該当ユーザーとの間で締結される別途の書面による契約に従うものとします。

本書に記載された指示は、製品を正確かつ安全に使用するために、資格を有し、適切な訓練を受けた担当者によって厳密かつ明確に遵守されなければなりません。Parse Biosciences は、ここに記載された条件に厳密に従わなかったことによって生じた直接的、間接的、結果的または偶発的な損害について、いかなる責任も負いません。

本書には、第三者の情報源、ハードウェアまたはソフトウェア、製品、サービス、または第三者のウェブサイト（総称して「第三者情報」）に関する記載が含まれることがあります。Parse Biosciences はこれら第三者情報を管理しておらず、それらに関する一切の責任を負いません。本書に第三者情報が含まれていることは、Parse Biosciences によるその情報または第三者自体の支持や推奨を意味するものではありません。

本書に記載された製品は購入者による 1 回限りの使用のために提供されるものであり、再使用、再生、または再販売はできません。また、これらの製品は、Parse Biosciences およびその認定代理人以外の者によって改変、変更、修正されることはなりません。Parse Biosciences は、かかる改変、変更、修正に対して責任を負いません。本書に記載された製品は、以下の特許のいずれかまたは複数によって保護されている可能性があります：

米国特許第 10,900,065 号

米国特許第 11,168,355 号

米国特許第 11,427,856 号

米国特許第 11,634,751 号

米国特許第 11,639,519 号

米国特許第 11,680,283 号

米国およびその他の国における特許が保護されています。

Parse および EVERCODE は Parse Biosciences, Inc. の商標です。ここに提供されている情報は、Parse Biosciences およびそのライセンサーの独占的財産です。

Copyright (c) 2024 Parse Biosciences. All Rights Reserved.

目次

オーバービュー.....	5
ワークフロー.....	5
プロトコルの所要時間	9
重要なガイドライン	11
Part List	16
ユーザーが準備する機器および消耗品	19
Section 1 : <i>In situ</i> 細胞/核 バーコーディング	23
1.1. セットアップおよびサンプルカウント	23
1.2. バーコーディング Round 1.....	25
1.3. バーコーディング Round 2.....	28
1.4. バーコーディング Round 3.....	32
1.5. 溶解とサプライブラリーの作製	34
Section 2: cDNA キャプチャーと増幅	37
2.1. cDNA キャプチャー	37
2.2. cDNA テンプレートスイッチ	41
2.3. cDNA 増幅	43
2.4. 増幅後の精製	46
2.5. cDNA 定量	48
Section 3 : シーケンシングライブラリーの調製	49
3.1. 断片化およびエンドプレップ	49

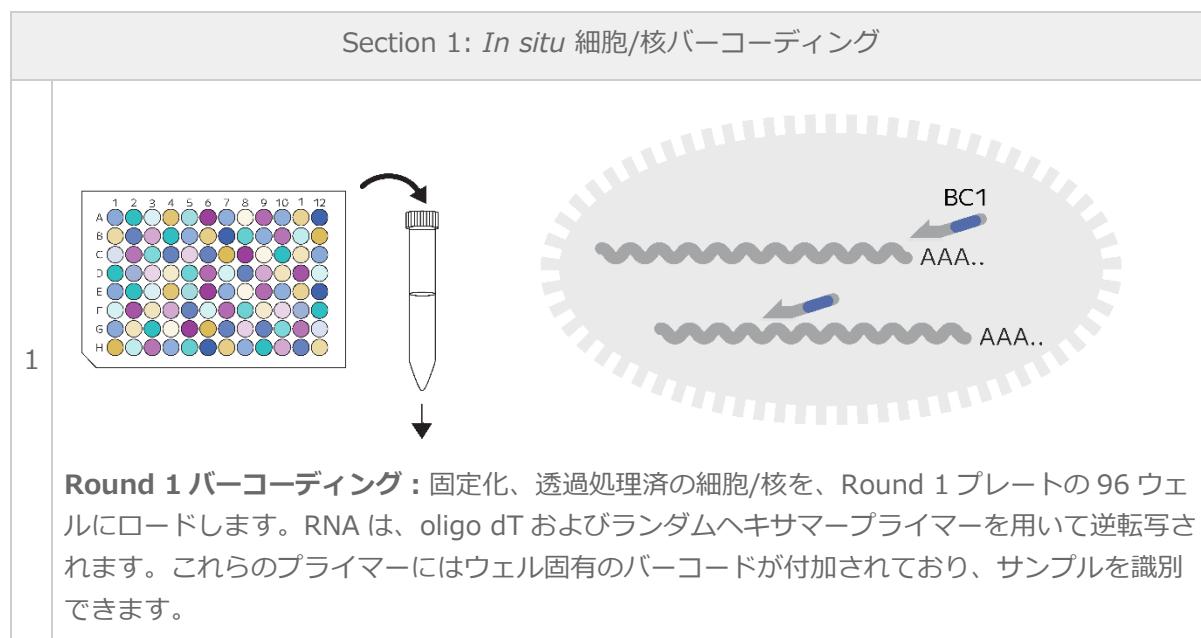
3.2. 断片化およびエンドプレッピング後のサイズセレクション	51
3.3. アダプターライゲーション	53
3.4. ライゲーション後の精製	54
3.5. バーコーディング Round 4	56
3.6. バーコーディング Round 4 後のサイズセレクション	58
3.7. シーケンシングライブラリーの定量	60
付録	61
付録 A: Sublibrary Generation Table	61
付録 B: シーケンシング情報	62
付録 C: サーマルサイクリングプログラム	65
付録 D: 改訂履歴	69

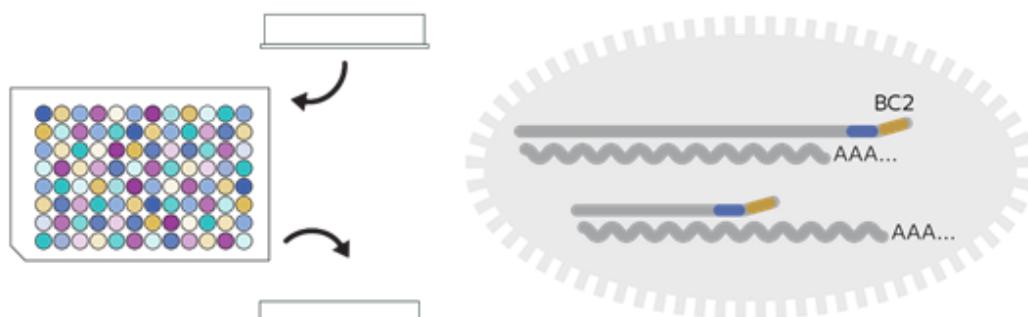
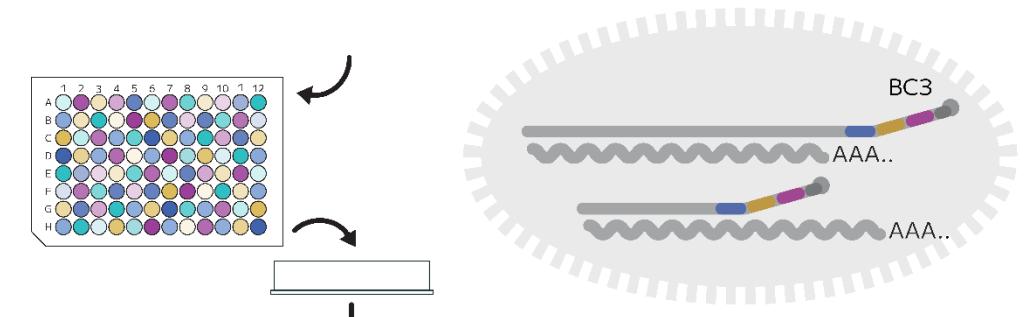
オーバービュー

ワークフロー

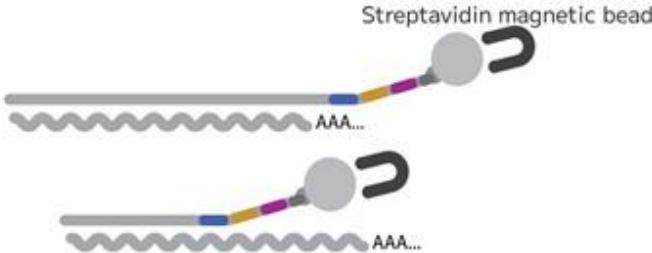
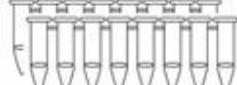
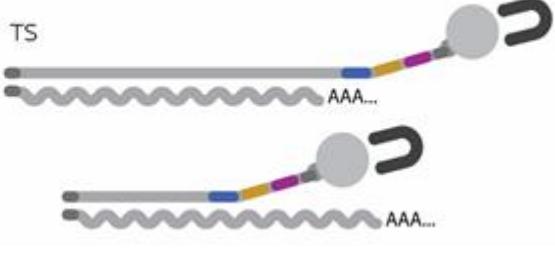
Evercode スプリット-プールコンビナトリアルバーコーディングは、大規模なシングルセル RNA-seq 実験に対してシンプルなワークフローを提供します。Evercode WT Mega v3 kit は、最大 1,000,000 個の細胞を最大 96 種類の異なる生物学的サンプルまたは実験条件にわたってプロファイリングすることができます。Evercode Fixation kit は、細胞および核を固定・透過することで、それらを個別の反応容器として機能させ、専用のマイクロ流体機器を必要としないプロセスを実現します。4 回のバーコーディング工程を通じて、固定された各細胞および核のトランскルiptオームには、ユニークなラベルが付与されます。4 回のバーコーディングにより、非常に多数のバーコードの組み合わせが可能となります。これは 1,000,000 万個の細胞および核それぞれにユニークなラベルを付与し、重複を回避するのに十分以上の組み合わせを持ちます。シーケンシング後、Parse Biosciences の Analysis Pipeline は、同じ 4 つのバーコードの組み合わせを持つリードを単一の細胞/核に割り当てます。

下表は、whole transcriptome workflow の high-level オーバービューを示しています。

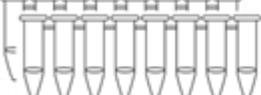


Section 1: <i>In situ</i> 細胞/核バーコーディング		
2		Round 2 バーコーディング: 細胞/核をプールし、Round 2 プレートにロードします。ウェル固有のバーコードを持つアダプターが、最初のバーコードにライゲーションされます。
3		Round 3 バーコーディング: 細胞/核をプールし、Round 3 プレートにロードします。3番目のバーコードが cDNA にライゲーションされます。cDNA には、Illumina TruSeq Read 2 配列およびビオチンも含まれます。
4		溶解 (ライス) およびサブライブラリーの作製: 細胞/核を 16 本のサブライブラリーにスプレット (分注) し、溶解します。

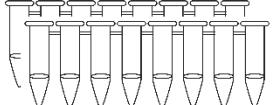
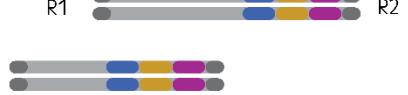
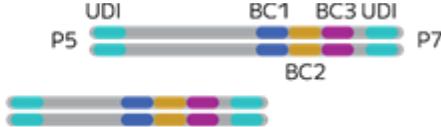
Section 2 : cDNA のキャプチャーよび増幅

		
1		cDNA キャプチャー: ビオチン化された cDNA は、ストレプトアビジンビーズによってキャプチャれます。
2		 cDNA テンプレートスイッチ: テンプレートスイッチ反応により、アダプターが cDNA の 3'末端に付加されます。
3		 cDNA 増幅: cDNA は、テンプレートスイッチアダプターおよび Illumina TruSeq Read 2 に特異的なプライマーを用いて増幅されます。

Section 3: シーケンシングライブラリーの調製

		
1		断片化およびエンドプレッピ: DNA の断片化、末端の修復、A テーリング

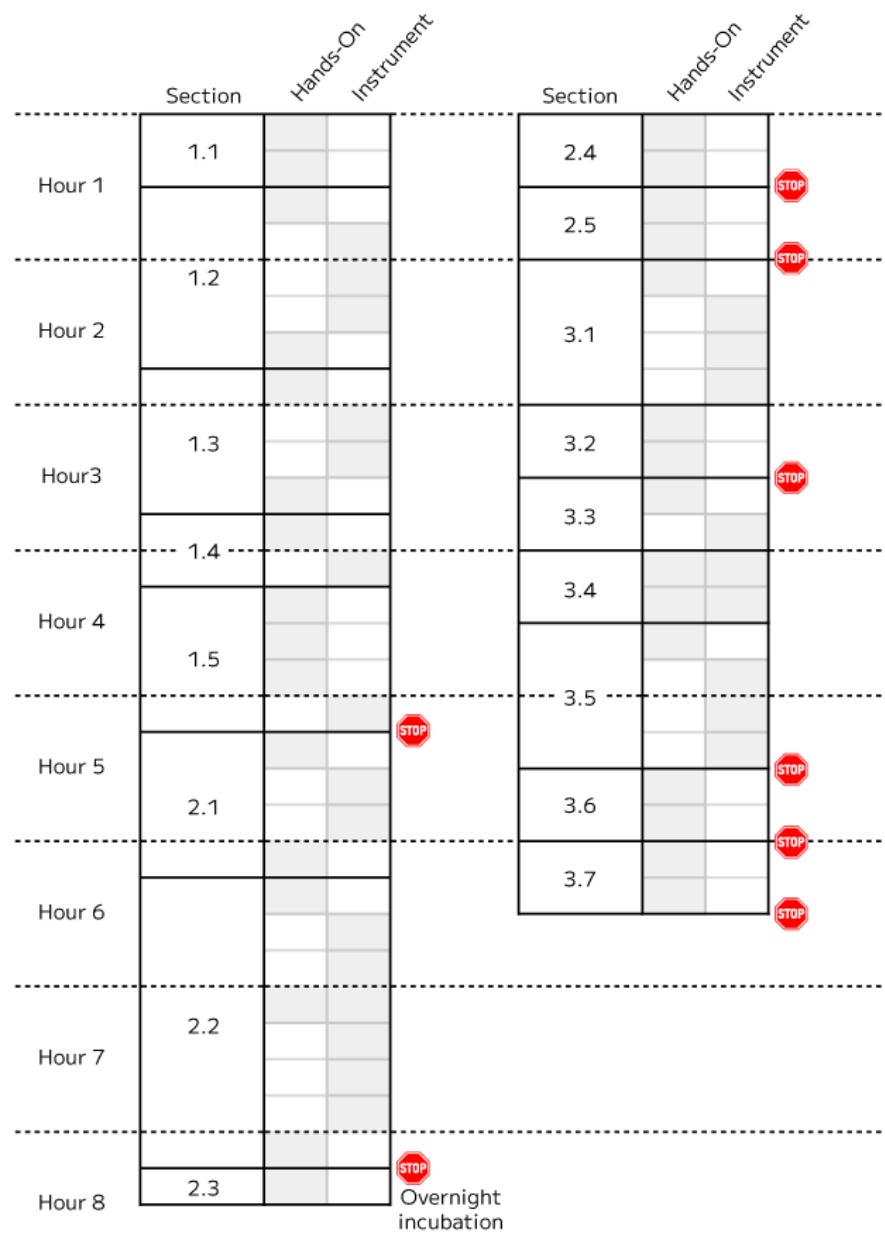
Section 3: シーケンシングライブラリーの調製

		
2		アダプターライゲーション: Illumina TruSeq R1 アダプターが DNA の 5'末端にライゲーションされます。
3		 Round 4 バーコーディング: シーケンシングライブラリーが増幅され、P5/P7 アダプターおよび 4 番目のバーコードが UDI-WT Plate により追加されます。

プロトコルの所要時間

以下の表には、トランск립トーム解析全体に必要な総時間および実作業時間の詳細が示されています。ワークフローの視覚的な図は、表の下に掲載されています。

説明	所要時間	実作業時間	SAFE STOPPING POINTS
Section 1: <i>In situ</i> 細胞／核バーコーディング			
1.1 セットアップおよびサンプルカウント	変動あり (30-90 min)	変動あり (30-90 min)	
1.2 バーコーディング Round 1	75 min	45 min	
1.3 バーコーディング Round 2	60 min	45 min	
1.4 バーコーディング Round 3	30 min	15 min	
1.5 溶解およびサプライブラーの作製	60 min	45 min	-80°C ≤ 6 months
Section 2: cDNA キャプチャーと増幅			
2.1 cDNA キャプチャー	60 min	30 min	
2.2 cDNA テンプレートスイッチ	120 min	30 min	4°C ≤ 18 hrs
2.3 cDNA 増幅	90 min	15 min	4°C ≤ 18 hrs in the thermocycler
2.4 増幅後の精製	30 min	30 min	
2.5 cDNA 定量	30 min	30 min	4°C ≤ 48 hrs or -20°C ≤ 3 months
Section 3: シーケンシングライブラーの調製			
3.1 断片化およびエンドプレップ	60 min	30 min	
3.2 断片化およびエンドプレップ後のサイズセレクション	30 min	30 min	4°C ≤ 18 hrs or -20°C ≤ 2 weeks
3.3 アダプターライゲーション	30 min	15 min	
3.4 ライゲーション後の精製	30 min	30 min	
3.5 バーコーディング Round 4	45 min	15 min	4°C ≤ 18 hrs in the thermocycler
3.6 バーコーディング Round 4 後のサイズセレクション	30 min	30 min	
3.7 シーケンシングライブラーの定量	30 min	30 min	-20°C ≤ 3 months



重要なガイドライン

以下のガイドラインは、最適な性能を引き出すための補足情報を提供します。以下に記載されていない質問については、support@parsebiosciences.comまでお問い合わせください。また、サポートサイト (<https://support.parsebiosciences.com/>) には追加のリソースやビデオのライブラリもあります。

サンプルインプット

- このプロトコルは、Evercode Cell Fixation v3 または Evercode Nuclei Fixation v3 kit で固定された細胞または核から始まります。Evercode Cell Fixation v2 または Evercode Nuclei Fixation v2 kit で固定されたサンプルとも互換性があります。
- サンプルが凍結前にカウントされていた場合でも、保存および凍結・解凍の過程による変化を考慮し、解凍後にあらためて細胞／核のカウントを行うことを強く推奨します。通常、解凍後には5～15%程度の細胞数の減少が見込まれます。これらのカウントは、Round 1 プレートに細胞／核をどのように分注するかを決定するために使用され、目的とする細胞／核数を確保する上で非常に重要です。
- 多数の固定サンプルを処理する場合は、固定後にサンプルをアリコート（分注）し、Evercode Whole Transcriptome kit を使用するよりも前の日に、その分注したサンプルの細胞数をカウントすることを推奨します。分注方法については、Evercode Fixation ユーザーマニュアルに記載された推奨事項に従ってください。分注サンプルは、同様の保存期間および凍結融解を経ているため、これらの分注サンプルから得られる細胞／核のカウントは、固定直後のサンプルのカウントよりも、実際の条件をより正確に反映します。分注サンプルは、37°Cに設定したウォーターバスで2～4本ずつ解凍し、血球計算盤または他のカウント装置を用いてカウントしてください。カウント結果は「Sample Loading Table」に記録し、残ったカウント用の分注サンプルはすべて廃棄してください。
- 一度解凍した固定サンプルは、再凍結しないでください。

細胞/核のカウントと品質評価

- カウントには血球計算盤の使用を推奨しますが、他のカウントデバイスも使用可能です。可能であれば、Evercode Whole Transcriptome キットを初めて使用する際には、他のデバイスによるカウント結果は血球計算盤の結果と比較して検証してください。
- Evercode Whole Transcriptome kit を初めて使用する際には、各カウントステップで画像を保存することを推奨します。
- サンプルの品質を評価するために、トリパンブルーや、アクリジンオレンジとプロピジウムヨウ化物 (AO/PI、acridine orange and propidium iodide) などの生死染色試薬の使用を推奨します。

- 以下にトリパンブルーで染色された固定細胞の例を示します。高品質な固定サンプルは、單一で明瞭な細胞を有し、細胞凝集が5%未満であり、デブリが存在しません。凝集のレベルが高いと、シーケンシング後のダブルレット率の上昇につながります。固定された細胞の数を測定する際には、細胞数を過大評価しないように、デブリをカウントしないことが重要です。

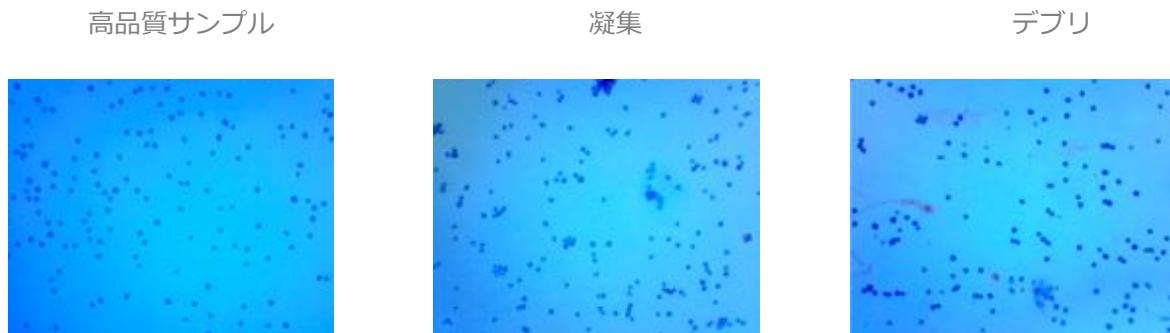


Figure 1: トリパンブルーで染色された固定細胞の例

RNase コンタミネーションの回避

- ワークフロー全体を通じて、RNase がサンプルや試薬に混入しないよう、標準的な予防措置を徹底してください。常に適切な実験用手袋を着用し、無菌操作を行って下さい。
- RNase はエタノールやイソプロパノールでは不活性化されませんが、RNaseZap RNase Decontamination Solution (Thermo Fisher Scientific) のような製品で不活性化されます。これらはベンチトップやピペットにスプレーして使用できます。
- RNase のコンタミネーションを防ぐために、フィルター付きのピペットチップを使用してください。

遠心分離

- このプロトコルでは、サンプルの種類に応じて最適な遠心速度と時間が設定されています。各サンプルタイプに適した遠心条件を調整し、保持 (retention) 率と再懸濁効率のバランスを最適化してください。
- このプロトコルにおけるすべての高速遠心工程では、スイングバケットローターの使用を推奨します。固定されたアングルローターを使用すると、細胞や核が大きく失われる可能性があります。

細胞/核 回収の最適化

- プロトコル全体を通して、遠心後の細胞/核を十分に再懸濁することが重要です。塊がなくなるまで、ゆっくりと繰り返しピッティングして再懸濁してください。細胞や核がチューブに付着しやすいため、損失を最小限に抑えるには、チューブの底や側面に沿って注意深く上下にピッティングしてください。

- 広口(wide bore)ピペットチップは細胞や核のペレットを適切に再懸濁しにくいため、使用は推奨されません。
- 使用する 15 mL 遠心チューブは、必ずポリプロピレン製であることを確認してください。ポリスチレン製のチューブを使用すると、サンプルが大きく失われる可能性があります。
- Evercode Whole Transcriptome kit を初めて使用する際は、各バーコーディング工程後の上清を回収しておくことを推奨します。まれにサンプル損失が大きくなる場合がありますが、そのような場合には、上清を解析することで最適化のポイントを特定することができます。

Sample Loading Table

- Parse Biosciences の Evercode WT Mega Sample Loading Table v2 (Excel スプレッドシート) は、実験を始める前に必ず記入を完成させてください。
- Sample Loading Table が正常に動作しない場合は、Sample Loading Table でマクロが有効になっていることを確認してください。計算に影響を与えないよう、編集は色付きセルのみにとどめてください。
- Sample Loading Table (Excel スプレッドシート) に従って、サンプルの濃度が不十分であるという稀な事態が発生した場合は、以下のいずれかを選択してください:
 - Sample Loading Table にエラーが出なくなるまで、「Max number barcoded cells (バーコード化する細胞の最大数)」を減らしてください。これにより、サンプル間の所定の比率は維持されますが、バーコード化される細胞数は少なくなります。
 - 各 Round 1 プレートの指定ウェルに 14 μ L の未希釀サンプル(undiluted sample)を加えてください。これにより、全体のバーコード化された細胞数は増加しますが、サンプル間の意図した比率は変化します。

セルストレーナー

- プロトコル全体を通して、適切なメッシュサイズのセルストレーナーを使用する必要があります。多くの細胞タイプには 30~40 μ m が適していますが、メッシュサイズはサンプルの種類に応じて選択してください。
- セルストレーナーでの細胞の回収率を最大限に高めるには、ピペットチップをメッシュに直接押し当ててください。チップとストレーナーの接触を維持し、約 1 秒で液体が通過するよう十分な圧力をかけることが重要です。参考動画はサポートサイトでご覧いただけます。

ボルテックス処理

- 各ステップで特に指示がない限り、プロトコル全体を通してサンプルや酵素のボルテックス処理は避けることを強く推奨します。

プレートシーリング

- 96 ウエルプレートの密封や開封を行う際は、PCR プレートのシールやウェル間に液体が飛び散らないよう注意してください。プレートを PCR チューブラックに固定することで、このような問題を最小限に抑えることができます。PCR プレートのシールは剥がしにくい場合があるため、プレートがチューブラック内にしっかりと固定されるように下方向に軽く圧力をかけながら、慎重にシールを剥がしてください。

Magnetic Rack と Bead Cleanups

- Parse Biosciences magnetic rack は、0.2 mL チューブにおける磁気ビーズ精製を迅速かつ効率的に行うため、強力な希土類磁石を使用しています。このラックには、High position と Low position の 2 種類のマグネットポジションがあり、重要なステップで最適な収量を得るために不可欠です。そのため、代替ラックの使用は推奨されません。
- ラックの位置を切り替えるには、本体を上下逆さにして、マグネットが 0.2 mL チューブの上部 (High) または下部 (Low) に近づくように調整します。詳細は下の図をご参照ください。

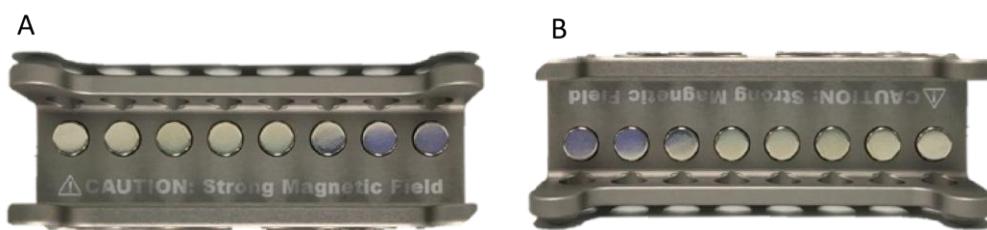


Figure 2: Parse Biosciences magnetic rack (A) High position、(B) Low position でのマグネット配置

- ビーズ精製中にサンプルの損失を防ぐためには、次のステップに進む前に上清が完全に透明であることを必ず確認してください。各ステップにおけるインキュベーション時間は推奨時間であるため、最終的には上清が澄んでいることを目視で確認して判断してください。完全に澄んだ上清の例は、下の図をご参照ください。上清中にビーズが残ったまま廃棄すると、細胞あたりの転写産物や遺伝子の検出数が減少する原因となります。



Figure 3: 澄んだ上清と、しっかりと集まったビーズペレットの例

サプライブラリーのロード

- Evercode WT Mega kit は、異なる Illumina インデックスバーコードを持つ 16 のサプライブラリーを作製します。これらは、プロトコルの Section 1 の完了後に、個別にも同時に処理およびシーケンスすることができます。
- サプライブラリーごとの細胞または核の数は、Section 1.5 で細胞をサプライブラリーに分ける際に、付録 A のガイドラインに従って決定されます。
- 新しいサンプルタイプを扱う場合、残りのサプライブラリーを処理する前に、1 つのサプライブラリーのみを用いて PCR 条件を最適化することが有益です。
- サプライブラリーには異なる数の細胞をロードすることができ、解析可能な最大の細胞数は、すべてのサプライブラリーにおける細胞/核の合計数です。
- 非対称的なサプライブラリーのローディングは、コスト効率の高いシーケンス品質管理を可能にします。1 つのサプライブラリーに数百個の細胞や核をロードして非常に深くシーケンスすることができます。そのデータを基に残りのサプライブラリーに適切なシーケンス深度を選択することができます。

インデックスプライマー

- UDI Plate - WT は、96 ウエルからなるプレートで、48 種類のユニークなデュアルインデックス (UDI) プライマーを含んでいます。各ウエルには、1 つのサプライブラリーに対する Barcoding Round 4 PCR 反応を 1 回行うのに十分な、使い切りの反応量が含まれています。そのため、UDI Plate - WT は複数の Evercode Whole Transcriptome kit で使用することができます。
- UDI Plate は、クロスコンタミネーションを最小限に抑えるために穿刺可能なホイルで密封されています。使用する際は、プレートのシールを 70%エタノールで拭き取り、新しいピペットチップで穿刺してください。ウエル間で液体が飛び散ったり混ざったりしないよう、十分に注意してください。使用済みのウエルは再封・再使用しないでください。
- UDI の選択は、左から右へ列単位で（インデックス 1~8 から開始して）行うことを推奨します。UDI 配列は付録 B に記載されています。

サーマルサイクリングプログラム

- ワークフロー全体で必要となるサーマルサイクリングプログラムを事前に設定しておくことを推奨します。これらの概要は付録 C に記載されています。

Part List

Evercode WT Mega v3 kit には、以下のボックスが含まれています。これらの試薬に関する Safety Data Sheets は、ご要望に応じて提供可能です。

-20°C 試薬 -20°C 保管, PN MG100

LABEL	ITEM	PN	FORMAT	QTY
	Round 1 Plate	MG101	Green semi-skirted 96 well plate	1
	Round 2 Plate	MG102	Blue semi-skirted 96 well plate	1
	Round 3 Plate	MG103	Yellow semi-skirted 96 well plate	1
	Resuspension Buffer	MG104	5 mL tube	1
	Sample Dilution Buffer	MG105	2 mL tube	1
	Round 2 Ligation Buffer	MG106	5 mL tube	1
	Round 2 Ligation Enzyme	MG107	1.5 mL tube	1
	Round 2 Stop Buffer	MG108	2 mL tube	1
	Round 3 Stop Buffer	MG109	5 mL tube	1
	Pre-Lysis Wash Buffer	MG110	5 mL tube	1

LABEL	ITEM	PN	FORMAT	QTY
	Round 3 Ligation Enzyme	MG111	1.5 mL tube	1
	Pre-Lysis Dilution Buffer	MG112	2 mL tube	1
	Lysis Enzyme	MG113	1.5 mL tube	1
	Bead Wash Buffer	MG114	5 mL tube	1
	Wash Buffer 1	MG115	5 mL tube	1
	Wash Buffer 2	MG116	5 mL tube	1
	Capture Enhancer	MG117	1.5 mL tube	1
	Binding Buffer	MG118	1.5 mL tube	1
	Wash Buffer 3	MG119	5 mL tube	1
	Template Switch Buffer	MG120	2 mL tube	1
	Template Switch Enzyme	MG121	1.5 mL tube	1
	Template Switch Primer	MG122	1.5 mL tube	1
	cDNA Amp Mix	MG123	1.5 mL tube	1

LABEL	ITEM	PN	FORMAT	QTY
	cDNA Amp Primers	MG124	1.5 mL tube	1
	Fragm/End Prep Buffer	MG125	1.5 mL tube	1
	Fragm/End Prep Enzymes	MG126	1.5 mL tube	1
	Ligation Adapter	MG127	1.5 mL tube	1
	Adapter Ligation Buffer	MG128	1.5 mL tube	1
	Adapter Ligation Enzyme	MG129	1.5 mL tube	1
	Library Amp Mix	MG130	1.5 mL tube	1

4°C 試薬 4°C 保管, PN MG200

LABEL	ITEM	PN	FORMAT	QTY
	Spin Additive	MG201	1.5 mL tube	1
	Lysis Buffer	MG202	1.5 mL tube	1
	Streptavidin Beads	MG203	1.5 mL tube	1

ユーザーが準備する機器および消耗品

以下の機器および試薬はプロトコルの実施に必要ですが、キットには含まれていません。ただし、フリーザーなどの標準的な実験機器はこの一覧には含まれていない点にご注意ください。



Note: UDI Plate – WT は ECWT3501 には含まれていますが、ECWT3500 には含まれていません。ECWT3500 を使用する場合は、UDI Plate – WT を別途購入する必要があります。

機器一覧

ITEM	SUPPLIER	PN	NOTES
Parse Biosciences Magnetic Rack	Parse Biosciences	SB1004	代替の 0.2 mL PCR チューブラックは推奨しません。転写物および遺伝子の検出感度が低下する可能性があります。
スイングバケットローター付き遠心機	Various Suppliers	Varies	15 mL 遠心チューブおよび 96 ウエルプレートに対応し、4°Cまでの冷却が可能なこと。
マイクロ遠心機	Various Suppliers	Varies	1.5 mL および 0.2 mL チューブに対応。
ウォーターバス	Various Suppliers	Varies	あるいは同等の thermomixer、ヒートブロック、または bead bath で、37°Cを保持できるものでも可。
2 台の ヒートブロック	Various Suppliers	Varies	あるいは同等のウォーターバス、bead bath、または thermomixer などでも可。48°C~68°Cの温度保持が可能で、1.5 mL、2 mL、5 mL チューブに対応していること。
Hemocytometer 血球計算盤	Sigma-Aldrich®	Z359629	他の細胞カウント装置もご利用いただけますが、ご使用の際は血球計算盤と比較して検証することをお勧めします。
PCR チューブラック	Various Suppliers	Varies	セミスカート付き 96 ウエル PCR プレートと密閉可能なフタを保持、設置できるもの。
プレートシールアプリケーター (Plate Seal Applicator)	Various Suppliers	Varies	96 ウエルプレートにシーリングフィルムを貼り付けることが可能なものの。

ITEM	SUPPLIER	PN	NOTES
シングルチャンネルピペット: P20, P200, P1000 12 チャンネルピペット: P20, P200	Various Suppliers	Varies	8 チャンネルピペットで 12 チャンネルピペットの代用が可能です。
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories®	1861096	セミスカート付き 96 ウエルプレート、0.2 mL の PCR チューブ、および最大 100 µL のサンプル容量に対応した同等のサーマルサイクラーでも使用可能です。また、4~98°C での加熱および冷却が可能であり、30~105°C の加熱が可能なフタを備えている必要があります。
6-Tube Magnetic Separation Rack	New England Biolabs®	S1506S	1.5 mL チューブ対応の同等の magnetic rack でも可。
Vortex-Genie 2®	Scientific Industries®	SI-0236	
6-inch Platform	Scientific Industries	146-6005-00	
Microplate Foam Insert	Scientific Industries	504-0235-00	
Qubit™ Flex Fluorometer	Thermo Fisher Scientific®	Q33327	同等の蛍光測定装置でも可。
2100 Bioanalyzer	Agilent®	G2939BA	
4200 TapeStation System	Agilent	G2991BA	いずれか一方を選択。

消耗品一覧

ITEM	SUPPLIER	PN	NOTES
UDI Plate - WT	Parse Biosciences	UDI1001	各 96 ウエルプレートには、Evercode kit (48 種のサブライブライマー) に対応した 48 種類の使い切り反応が含まれています。UDI Plate - WT は、Evercode kit に同梱されている場合もありますが、別途購入することも可能です。

ITEM	SUPPLIER	PN	NOTES
試薬リザーバー	Various Suppliers	Varies	無菌かつヌクレアーゼフリーの 10 mL または 25 mL の試薬用トレー
Falcon® High Clarity PP Centrifuge Tubes, 15 mL	Corning®	352097	または同等の 15 mL ポリプロピレン製遠心チューブでも可。ポリスチレン製遠心チューブは使用しないでください。細胞の大幅な損失を招くおそれがあります。
SWiSH™ Mini Cell Strainer	Stellar Scientific®	TC70-SWM-20 TC70-SWM-40 TC70-SWM-70 TC70-SWM-100	
pluriStrainer® Mini	pluriSelect®	43-10020-40 43-10040-40 43-10070-40 43-10100-40	いずれか、または同等の無菌セルストレーナーを使用し、細胞タイプに適したメッシュサイズを選択してください (20 µm、40 µm、70 µm、100 µm)。 FlowMi Cell Strainers (SP Bel-Art 製) の使用は推奨されていません。
Falcon® Cell Strainer	Corning®	431750 431751 431752	
EASYstrainer™, small	Greiner Bio-One™	542120 542140 542170 542100	
DNA LoBind® Tubes, 1.5 mL, Snap Cap	Eppendorf®	022431021	または同等の DNA 低吸着性・ヌクレアーゼフリーの 1.5 mL チューブでも可。
DNA LoBind® Tubes, 2 mL, Snap Cap	Eppendorf®	022431048	または同等の DNA 低吸着性・ヌクレアーゼフリーの 2.0 mL チューブでも可。
TempAssure® PCR 8-Tube Strips, 0.2 mL	USA Scientific®	1402-4700	または同等の nuclease-free 0.2 mL PCR チューブでも可。
AMPure® XP Reagent	Beckman Coulter®	A63880 (5 mL) A63881 (60mL)	
SPRIselect Reagent	Beckman Coulter	B23317 (5mL) B23318 (60mL)	いずれかを選択してください。他の磁性ビーズへの置き換えは推奨されません。
KAPA® Pure Beads	Roche®	KK8000 (5 mL) KK8001 (30mL)	

ITEM	SUPPLIER	PN	NOTES
SealPlate®	Excel Scientific	100-SEAL-PLT	または同等の PCR プレート用シールでも可。
Pipette Tips TR LTS 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Rainin®	17014961 17014963 17014967	DNA 低吸着性で、DNase/RNase フリーかつフィルター付きのピペットチップを使用してください。ワイドボアチップの使用は避けてください。
RNaseZap™ RNase Decontamination Solution	Thermo Fisher Scientific	AM9780	または同等の RNase Decontamination Solution でも可。
Ethyl alcohol, Pure	Sigma-Aldrich	459844	または同等の 100% 未変性エタノールでも可。
Nuclease-Free Water	Sigma-Aldrich	W4502	または同等のヌクレアーゼフリー水でも可。
トリパンブルー	Various Suppliers	Varies	または、AO/PI などの生細胞率評価用の代替色素でも可。
Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q33230 (100 assays) Q33231 (500 assays)	または同等の DNA 定量試薬でも可。
High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626	使用する Bioanalyzer または Tapestation に対応したものを選択してください。
High Sensitivity D5000 ScreenTape and Reagents	Agilent	5067-5592 (screen tape) 5067-5593 (sample buffer and ladder)	

Section 1: *In situ* 細胞/核 バーコーディング

1.1. セットアップおよびサンプルカウント

バーコーディングを行う前に、細胞や核を解凍してカウントします。適切な希釈率、濃度、ローディング位置 (well) は「Sample Loading Table」に基づいて決定されます。

バーコーディングの準備手順:

1. 「Evercode WT Mega Sample Loading Table v2」（Excel スプレッドシート）を開きます。この表は、後のステップで行うサンプルの希釈やプレートへのローディングの指針となります。
2. スイングバケットローター付きの遠心機を 4°C に冷却します。
3. ウォーターバスを 37°C に設定します。
4. 発泡スチロールの保冷用ボックスなどの容器に氷を入れます。
5. 血球計算盤、フローサイトメーター、またはその他の細胞カウント装置を用意します。
6. 以下のアイテムを集め、下記に記載の通りに取り扱います。

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
Round 1 Plate	-20°C Reagents	1	氷の上に直接置く。
Round 2 Plate	-20°C Reagents	1	
○ Resuspension Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍し、その後氷上に保管。3回転倒混和する。
● Sample Dilution Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍し、Section 1.3 で使用するまで氷上に保管。使用前に 3回転倒混和する。
○ Round 2 Ligation Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍し、Section 1.3 で使用するまで氷上に保管。使用前に 3回転倒混和する。
● Spin Additive	4°C Reagents	1	室温で保管。

7. 以前に固定した細胞/核サンプルを、37°C に設定したウォーターバスで、すべての氷の結晶が溶けるまで解凍します。各サンプルをピペットティングで十分に混合し、氷上で保管します。

8. 氷上の作業時間を最小限に抑えながら、血球計算盤または他の細胞カウント装置を用いて、サンプル中の細胞/核の数を測定します。



注記: 多数の固定サンプルを処理する場合は、固定後にサンプルを分注し、Evercode Whole Transcriptome kit を使用するよりも前の日に分注サンプルのカウントを行うことを推奨します。詳細は「重要なガイドライン」セクションを参照してください。

9. サンプル名および細胞/核のカウントを「Sample Loading Table」に記録します。



注記: Sample Loading Table にエラーがある場合は、「重要なガイドライン」セクションを参照してください。

10. Round 1 プレートをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムを実行します。

THAW ROUND 1 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	26 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C

11. Sample Loading Table で表示された値に従って、各サンプルを● Sample Dilution Buffer で希釈し、氷上で保管します。

12. 直ちに Section 1.2 に進みます。

1.2. バーコーディング Round 1

サンプルは Round 1 プレートにロードされます。*in situ* 逆転写反応により、ウェル特異的なバーコードが付加され、これがサンプルバーコードとしても機能します。細胞/核はその後、プールされ、遠心され、再懸濁されます。

Round1 バーコードを付加するには:

1. サーマルサイクラーから Round 1 プレートを穩やかに取り出し、0.2 mL チューブラックにセットして、4°C、100×g で **1 分間** 遠心します。
2. 遠心後、Round 1 プレートを PCR チューブラックに移し、プレートシールを剥がし、氷上で保管します。



注記: PCR プレートのシールは剥がしにくい場合があります。プレートが動かないように下方に向く軽く圧をかけながら、慎重にシールを剥がしてください。これによりクロスコンタミネーションのリスクを最小限に抑えられます。

3. Round 1 プレートを氷上に置いたまま、Sample Loading Table に従って、各希釀サンプルをそれぞれのウェルに **14 μL** ずつ分注します。各サンプルは分注直後に、ピッティングで 3 回混合してください。



重要! この工程ではチップを再使用してはいけません。プレートの各ウェルに細胞をピッティングする際は、必ず新しいチップを使用しなければなりません。一度でもウェルに入れたチップを、リザーバーや別のウェルに戻して使用することは絶対に避けてください。



注記: 同じサンプルを複数のウェルに分注する際は、細胞や核が沈殿しないように、各分注の前に穩やかにピッティングして混合してください。ボルテックスで混合しないでください。

4. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 1 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 1 プレートに新しいプレートシールを貼り付けます。

5. Round 1 プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。
完了後は、直ちに次のステップに進んでください。

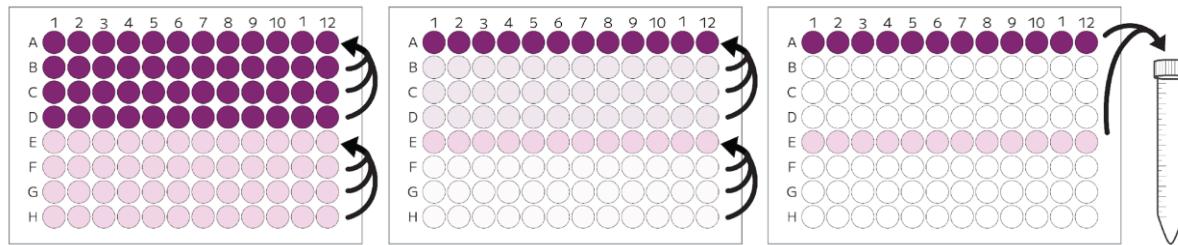
BARCODING ROUND 1			
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume	
40 min	70°C	40 µL	
Step	Time	Temperature	Cycles
1	10 min	50°C	1
2	12 s	8°C	3
3	45 s	15°C	
4	45 s	20°C	
5	30 s	30°C	1
6	2 min	42°C	
7	3 min	50°C	
8	5 min	50°C	1
9	Hold	4°C	1

6. Round 1 プレートをサーマルサイクラーから取り出し、PCR チューブラックに置き、氷上で保管してください。
7. Round 2 プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。
プログラムが実行中の間に直ちに次のステップに進んでください。

THAW ROUND 2 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	10 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C

8. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 1 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 1 プレートのシールを剥がしてください。

9. プレートとチューブを氷上に置いた状態で、以下の手順で Round 1 プレートのすべてのウェルの内容物を 15 mL 遠心チューブにまとめます:



- i. マルチチャンネル P200 を 30 μ L に設定し、行 B のサンプルをピッティングで 3 回混和します。
 - ii. 行 B から行 A に 30 μ L を移します。
 - iii. 行 C-D についても手順 i-ii を繰り返し、サンプルを混合した後に行 A へ移します。
 - iv. マルチチャンネル P20 を 10 μ L に設定し、行 B-D に残っている液体をすべて行 A に移します。
 - v. 行 A の細胞／核が手順 i のとおり懸濁していることを確認します。その後、シングルチャンネル P200 を 200 μ L に設定し、行 A の各ウェルの全液量を同じ 15 mL チューブに移します。
 - vi. 行 F-H についても手順 i-ii を繰り返し、サンプルを混合した後に行 E へ移します。
 - vii. マルチチャンネル P20 を 10 μ L に設定し、行 F-H に残っている液体をすべて行 E に移します。
 - viii. 行 E の細胞／核が手順 i のとおり懸濁していることを確認します。その後、シングルチャンネル P200 を 200 μ L に設定し、行 E の各ウェルの全液量を同じ 15 mL チューブに移します。
10. プールされた細胞を含む 15 mL チューブに、19.2 μ L の● Spin Additive を加えます。● Spin Additive は後のステップでも必要になるため、廃棄しないでください。
11. チューブを 1 回だけ穏やかに転倒混和させて混合します。
12. 15 mL チューブをスイングバケットローターで、4°C、200~500 \times g で 5~10 分間遠心します。遠心が終了したら、すぐに次のステップに進みます。

CRITICAL! 適切な遠心速度と時間は、各サンプルの種類ごとに、保持 (retention) 率と再懸濁効率を最適化するために経験的に決定する必要があります。遠心が強すぎると、細胞構造が損傷し、データの質が低下するおそれがあります。固定処理中に使用した遠心速度で十分な保持が得られている場合は、本プロトコル全体を通じて同じ速度を使用してください。

CRITICAL! 迅速に作業を進めるとともに、ペレットが崩れないようにサンプルを丁寧に取り扱ってください。ペレットが崩れると、データの品質に大きな影響を及ぼす可能性があります。

13. ペレットの上に約 40 μ L の液体が残るまで上清を除去してください。最初の 1 mL には P1000 ピペットを使用し、残りの上清には P200 ピペットを使用してください。



Note: 細胞の数や種類によっては、ペレットが目視できない場合があります。

14. ペレットを **1 mL の** Resuspension Buffer で完全に、しかし穏やかに再懸濁してください。

15. さらに **1 mL の** Resuspension Buffer を加え、合計で 2 mL となるようにします。氷上で保管します。

16. すぐに Section 1.3 へ進みます。



注記: low input fixation ワークフローを実施した場合は、Section 1.3 に進む前に、以下のステップを実行してください。

17. 新しい 15 mL チューブにセルストレーナーをセットし、P1000 ピペットを用いてサンプルをセルストレーナーに通し、サンプルを 15 mL チューブに回収します。サンプルを移す前に、サンプルをピッティングで穏やかに 2 回混合してください。

1.3. バーコーディング Round 2

プールされた細胞/核はライゲーションマスターMixスに加えられ、それが Round 2 プレートにロードされます。 *in situ* ライゲーション反応により、cDNA の 3'末端にウェル特異的なバーコードが付加されます。このライゲーション反応は Round 2 Stop Buffer で停止され、細胞/核はプールされ、セルストレーナーに通されます。

Round 2 バーコードを付加するには:

1. 以下のアイテムを準備し、下記に記載の通りに取り扱ってください:

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
● Round 2 Ligation Enzyme	-20°C Reagents	1	氷上に直接置いてください。使用前に軽く遠心してください。
● Round 2 Stop Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上に保管してください。ボルテックスで混合します。
Round 3 Plate	-20°C Reagents	1	氷上に直接置いてください。

2. 氷上で、Section 1.2 で調製した Resuspension Buffer 中のサンプルに、以下を加えて Round 2 Ligation Master Mix を調製します。P1000 ピペットを 1000 μ L に設定し、10 回ピッティングして十分に混合します。氷上で保管してください。



注記: 使用前に、Section 1.1 で -20 度冷凍庫から取り出し、氷上に保管していた Round 2 Ligation Buffer を 3 回、転倒混和してください。

ROUND 2 LIGATION MASTER MIX	
Sample in Resuspension Buffer	2 mL
○ Round 2 Ligation Buffer	1.95 mL
● Round 2 Ligation Enzyme	20 μ L
Total Volume	3.97 mL

3. サーマルサイクラーから Round 2 プレートを取り出し、PCR チューブラックにセットして、4°Cで 100 × g にて **1 分間** 遠心します。
4. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 2 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 2 プレートのシールを剥がし、氷上で保管してください。
5. Round 2 Ligation Master Mix を P1000 ピペットを使ってリザーバーに移してください。
6. Round 2 プレートを氷上に置いた状態で、リザーバーをベンチ上に置き、Round 2 Ligation Master Mix を Round 2 プレートの各ウェルに、以下の手順に従って移してください：
 - i. マルチチャンネル P200 を 40 μ L に設定し、ピッティングを 2 回行ってリザーバー内のサンプルを混合します。
 - ii. 混合液 **40 μ L** を Round 2 プレートの行 A に分注し、ピッティング 2 回で混合します。
 - iii. i～ii を繰り返して、リザーバー内でサンプルを混合し、行 B～H に分注します。



重要! この工程ではチップを再使用してはいけません。プレートの各ウェルに細胞をピッティングする際は、必ず新しいチップを使用しなければなりません。一度でもウェルに入れたチップを、リザーバーや別のウェルに戻して使用することは絶対に避けてください。



注記: マルチチャンネルピペットで最後の行に移すために液量が不足している場合は、リザーバーを傾け、シングルチャンネルピペットを使って残りの液体を移してください。それでもすべてのウェルを満たすのに液量が足りない場合は、いくつかのウェルが空のままでも実験結果には影響しません。

7. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 2 プレートしっかりと固定された状態で、Round 2 プレートに新しいシールを貼り付けてください。

8. Round 2 プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。
完了後、直ちに次のステップに進んでください。

BARCODING ROUND 2		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	50°C	50 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	16°C
2	Hold	4°C

9. ● Round 2 Stop Buffer を軽くボルテックスして、沈殿がないことを確認してください。そのチューブ内の全量を新しいリザーバーに P1000 ピペットを使って移してください。
10. Round 2 プレートをサーマルサイクラーから取り出し、PCR チューブラックにセットし、プレートシールを剥がして氷上に保管してください。
11. Round 2 プレートを氷上に、リザーバーをベンチ上に置いた状態で、● Round 2 Stop Buffer を **10 µL** ずつ Round 2 プレートの各ウェルにマルチチャンネル P20 を使って分注してください。各分注の後に、必ずピッティングを 3 回行って混合してください。



重要! この工程ではチップを再使用してはいけません。● Round 2 Stop Buffer をプレートの各ウェルに移してピッティングする際は、必ず新しいチップを使用しなければなりません。一度でもウェルに入れたチップを、リザーバーや別のウェルに戻して使用することは絶対に避けてください。

12. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 2 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 2 プレートに新しいシールを貼り付けてください。
13. Round 2 プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。プログラムの実行中に次のステップに進んでください。

ROUND 2 STOP		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
5 min	50°C	60 µL
Step	Time	Temperature
1	5 min	16°C
2	Hold	4°C

14. Round 3 プレートを別のサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。プログラムの実行中に次のステップに進んでください。

THAW ROUND 3 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	10 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C



注記: 2 台目のサーマルサイクラーが使用できない場合は、ステップ 13 で使用したものをステップ 14 で再利用して構いません。ただし、「Thaw Round 3 Plate」プログラムが完了するまでは、Round 2 プレートを氷上で保管してください。

15. Round 2 Stop プログラムが完了したらすぐに、Round 2 プレートをサーマルサイクラーから PCR チューブラックに移し、プレートシールを剥がして氷上に保管してください。

16. Round 2 プレートを氷上に、リザーバーをベンチ上に置いた状態で、Round 2 プレート内の全液体を次の手順に従って新しいリザーバーに移してください：

- マルチチャンネル P200 を 50 µL に設定し、行 A のサンプルをピッティングで 3 回混合してください。
- 行 A からリザーバーに **50 µL** 移します。
- 同様の操作 (i~ii) を行 B~H に対して繰り返し、リザーバーに移します。
- Round 2 プレートに残っている液体を、マルチチャンネル P20 を 10 µL に設定してリザーバーに移してください。

17. P1000 ピペットを使用して、サンプルをセルストレーナーに通して、新しいリザーバーに移してください。それぞれの移し替え（ストレーナー処理）の前に、ピッティングを 2 回行って、リザーバー内の細胞を穏やかに混ぜ、リザーバーを傾けて可能な限り液体を回収してください。



重要! グローブをした手でセルストレーナーのメッシュ部分に直接触れないでください。全ての液体がストレーナーを通過するよう、ピペットの先端をメッシュにしっかりと押し当てて密着させ、プランジャーを一定の速度で押し下げてください。液体は約 1 秒でストレーナーを通過するべきです。



注記: プーリングやセルストレーナー処理の過程で気泡が生じることがありますが、実験の品質には影響しません。

18. 直ちに Section 1.4 に進んでください。

1.4. バーコーディング Round 3

● Round 3 Ligation Enzyme が、プールされた細胞/核に加えられ、それが Round 3 プレートにロードされます。2 回目の *in situ* ライゲーション反応により、3 つ目のウェル特異的バーコード、Illumina TruSeq Read 2 配列、ならびにビオチンが付加されます。サンプルはその後、再びプールされ、セルストレーナーに通されます。

Round 3 バーコードを付加するには:

- 以下の試薬を-20 度冷凍庫、4 度冷蔵庫から取り出し、下記に記載の通りに取り扱ってください:

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
○ Round 3 Stop Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍し、その後氷上で保管してください。ボルテックスで混合。
○ Pre-Lysis Wash Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍し、その後氷上で保管してください。3 回転倒混和。
● Round 3 Ligation Enzyme	-20°C Reagents	1	氷上に直接置き、使用前に軽く遠心してください。
● Pre-Lysis Dilution Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上で保管。3 回転倒混和。
● Lysis Enzyme	-20°C Reagents	1	氷上に直接置き、使用前に軽く遠心。
● Lysis Buffer	4°C Reagents	1	使用するまで 37°C のウォーターバスに入れておく。

- ストレーナーに通したサンプルが入ったリザーバーに、● Round 3 Ligation Enzyme を **20 μL** 加えます。P1000 ピペットを 1000 μL に設定し、ピペッティングを 20 回行って穩やかに混合してください。
- Round 3 プレートをサーマルサイクラーから取り出し、PCR チューブラックにセットし、4°C で 100×g で **1 分間**遠心してください。
- 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 3 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 3 プレートのシールを剥がしてください。
- Round 3 プレートを氷上に、リザーバーをベンチ上に置いた状態で、以下の手順でリザーバーから Round 3 プレートの各ウェルに **50 μL** ずつ移してください:
 - マルチチャンネル P200 を 50 μL に設定し、リザーバー内のサンプルをピペッティング 2 回で混合します。
 - 混合液 **50 μL** を Round 3 プレートの行 A に移し、ピペッティング 2 回で混合します。

iii. 同様の操作 (i~ii) を行 B~H に繰り返し、リザーバーからプレートに移します。



重要! この工程ではチップを再使用してはいけません。プレートの各ウェルに細胞をピペッティングする際は、必ず新しいチップを使用しなければなりません。一度でもウェルに入れたチップを、リザーバーや別のウェルに戻して使用することは絶対に避けてください。



注記: マルチチャンネルピペットで最後の行に混合液を移すのに液量が不足している場合は、リザーバーを傾けてシングルチャンネルピペットで残りの液体を分注してください。それでもすべてのウェルを満たすのに液量が足りない場合は、いくつかのウェルが空のままでも実験結果には影響しません。

6. 平らな面に置いた PCR チューブラックに Round 3 プレートがしっかりと固定された状態で、Round 3 プレートに新しいシールを貼り付けてください。
7. Round 3 プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。

BARCODING ROUND 3		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	50°C	60 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	16°C
2	Hold	4°C

8. ○ Round 3 Stop Buffer を軽くボルテックスし、沈殿がないことを確認してください。そのチューブ内の全量を P1000 ピペットを使って新しいリザーバーに移してください。
9. Round 3 プレートをサーマルサイクラーから取り出し、PCR チューブラックにセットし、プレートシールを剥がして氷上に保管してください。
10. Round 3 プレートを氷上に、リザーバーをベンチ上に置いた状態で、○ Round 3 Stop Buffer を **20 µL** ずつ、マルチチャンネル P20 を使って Round 3 プレートの各ウェルに移してください。各分注の後には、正確に 3 回ピペッティングして混合してください。



重要! この工程ではチップを再使用してはいけません。○Round 3 Stop Buffer をプレートの各ウェルにピペッティングする際は、必ず新しいチップを使用しなければなりません。一度でもウェルに入れたチップを、リザーバーや他のウェルに戻して使用することは絶対に避けてください。

11. インキュベーションせず、直ちに次のステップに進んでください。
12. Round 3 プレートを氷上に、リザーバーをベンチ上に置いた状態で、Round 3 プレート内のすべての液体を次の手順に従って新しいリザーバーに移してください:

- i. マルチチャンネル P200 を 70 μL に設定し、行 A のサンプルをピペットティング 3 回で混合します。
- ii. 行 A からリザーバーに **70 μL** 移します。
- iii. i~ii の手順を行 B~H について繰り返し、混合後、リザーバーに移します。
- iv. Round 3 プレートに残った液体は、マルチチャンネル P20 を 10 μL に設定してリザーバーに移してください。

13. P1000 ピペットを使用して、サンプルをセルストレーナーに通して新しい 15 mL チューブに移してください。それぞれの移し替え（セルストレーナー処理）の前に、リザーバー内の細胞をピペットティングで 2 回穏やかに混ぜ、リザーバーを傾けて可能な限り液体を回収してください。



注記: プーリングやストレーナー処理の過程で気泡が発生することがあります。実験の結果や品質には影響しません。

14. 直ちに Section 1.5 に進んでください。

1.5. 溶解とサブライブラリーの作製

細胞/核プールは遠心、洗浄され、● Pre-Lysis Dilution Buffer に再懸濁されます。細胞/核はカウントされ、付録 A の Sublibrary Generation Table に基づいてサブライブラリーに分けられます。これらのサブライブラリーは溶解され、-80°C で保存されます。

サブライブラリーを作製・溶解するには:

1. サンプルの入った 15 mL チューブに● Spin Additive を **70 μL** 加えます。1 回、穏やかに転倒混和してください。
2. 15 mL チューブをスイングバケットローターで 200–500 \times g、4°C で **5~10 分間** 遠心します。遠心終了後は直ちに次のステップに進んでください。



重要! 迅速に作業を行い、ペレットが崩れないようにサンプルを穏やかに取り扱ってください。ペレットが崩れると、データの品質に影響を及ぼす可能性があります。

3. ペレットの上に約 40 μL の液体が残るまで上清を除去してください。最初の 6 mL は P1000 ピペットを使用し、残りは P200 ピペットで除去します。



注記: 細胞/核の数やサンプルの種類によっては、ペレットが目に見えない場合もあります。

4. ペレットを **1 mL** の○ Pre-Lysis Wash Buffer で、完全に、しかし穩やかに再懸濁してください。
5. ○ Pre-Lysis Wash Buffer を **3 mL** 追加し、合計 **4 mL** になるようにしてください。
6. **15 mL** チューブをスイングバケットローターで **200~500 × g**、**4°C** で **5~10 分間**遠心してください。遠心後は直ちに次のステップに進んでください。



重要! 迅速に作業を行い、ペレットが崩れないようにサンプルを慎重に取り扱ってください。ペレットが崩れると、データの品質に影響を及ぼす可能性があります。

7. ペレットの上に約 **40 μL** の液体が残るまで上清を除去してください。最初の **3 mL** には P1000 ピペットを使用し、残りには P200 ピペットを使用してください。
8. ペレットを **200 μL** の● Pre-Lysis Dilution Buffer で、完全に、しかし穩やかに再懸濁し、最終体積が **240 μL** になるようにしてください。その後、氷上で保管してください。



注記: ● Pre-Lysis Dilution Buffer は他のステップで使用するため、廃棄しないでください。

9. 氷上の時間を最小限に抑えつつ、血球計算盤または他の細胞カウント装置を用いて、サンプル中の細胞または核の数をカウントし、その結果を記録してください。



重要! サブライブラリーへの正確な分注のために、血球計算盤を使用し、カウント用の分注の前にサンプルを注意深く混合することを強く推奨します。

10. 細胞/核をどのようにサブライブラリーに分けるかを決定してください。分け方の方針については、「重要なガイドライン」セクションの「サブライブラリーの分注（ロード）」を参照してください。また、付録 A の Sublibrary Generation Table を用いて、各サブライブラリーに加えるサンプルと● Pre-Lysis Dilution Buffer の体積を決定してください。



重要! 1 つのサブライブラリーに **62,500 個** を超える細胞/核を加えないでください。これを超えると、マルチプレット率の増加につながります。

11. それぞれの分注の前に、P200 ピペットを **200 μL** に設定して 5 回ピッティングし、細胞/核が懸濁していることを確認してください。その後、適切な体積のサンプルを 16 本の **0.2 mL** PCR チューブに加えます。
12. 総体積が **25 μL** になるように、適切な量の● Pre-Lysis Dilution Buffer を **0.2 mL** チューブに加えてください。

13. Lysis Master Mix を新しい 1.5 mL チューブで以下のように調製してください。P1000 ピペットを 425 μ L に設定し、ピッティングを 3 回行って混合します。室温で保管してください。

LYSIS MASTER MIX	
● Lysis Buffer	440 μ L
● Lysis Enzyme	88 μ L
Total Volume	528 μ L



注記: ● Lysis Buffer を使用する前に、沈殿がないことを確認してください。



重要! Lysis Master Mix を氷上に置かないでください。沈殿が形成されます。

14. 希釈した細胞/核の入った各 0.2 mL チューブに **30 μ L** の Lysis Master Mix を加えてください。室温で保管します。

15. 0.2 mL チューブを **1 分間** ボルテックスし、軽く遠心してください。

16. チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。サンプルを凍結せずに Section 2 に進む場合は、プログラムが実行中の間に Section 2 へ進んでください。

CELL/NUCLEI LYSIS		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	80°C	55 μ L
Step	Time	Temperature
1	15 min	65°C
2	Hold	4°C

17. ライセート（細胞溶解液）を-80°C で凍結するか、Section 2 に進んでください。



Safe stopping point : サプライブレーリーのライセートは、-80°C で最大 6 か月間保存できます。

Section 2: cDNA キャプチャーと増幅

2.1. cDNA キャプチャー

バーコード化された cDNA は、ストレプトアビジン磁気ビーズでキャプチャーされ、細胞デブリを除去するために洗浄されます。

cDNA をキャプチャーするには:

1. 発泡スチロールの保冷用ボックスなどの容器に氷を入れます。
2. それぞれのライセートにつき、nuclease-free water で希釈した 85% エタノールを 400 μ L 準備します。
3. 各ライセートあたり 80 μ L の SPRI ビーズを室温に戻します。
4. 以下の機器を準備します:
 - i. 1.5 mL チューブ用の magnetic rack
 - ii. 0.2 mL PCR チューブ用の Parse Biosciences magnetic rack
 - iii. 96 ウエルプレート用のアダプター付きボルテックス装置
5. 以下の試薬を集め、下記に記載の通りに取り扱ってください:

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
● Streptavidin Beads	4°C Reagents	1	室温で保管。
○ Bead Wash Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上で保管。3 回転倒混和。
○ Wash Buffer 1	-20°C Reagents	1	
○ Wash Buffer 2	-20°C Reagents	1	
● Capture Enhancer	-20°C Reagents	1	氷上に直接置き、使用前に軽く遠心。
● Binding Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上で保管。3 回転倒混和。

6. 必要なライセートの入ったチューブを、サーマルサイクラー (Section 1 から直接続ける場合) または -80°C で保管していた場所から取り出してください。

7. 凍結保存していた場合は、チューブをウォーターバスまたはサーマルサイクラーで 37°C、**5 分間** インキュベートしてください。



注記: 作業を開始する前に、沈殿がないことを確認してください。沈殿がある場合は、37°Cでさらに 5 分間インキュベートすれば十分です。

8. 軽く遠心し、室温で保管してください。
9. ● Capture Enhancer を軽く遠心し、P20 ピペットを 15 μL に設定してピッティングを 2 回行い、穏やかに混合してください。
10. ● Capture Enhancer を各ライセートチューブに **2.5 μL** 加えてください。
11. チューブを 96 ウエルの PCR チューブラックに置き、しっかりと押して固定し、キャップがしっかりと閉まっていることを確認してください。ラックにフタをしてください。
12. ラックをプレートアダプター付きのボルテックスミキサーにセットし、押してしっかりと固定してください。出力 100%で **1 分間** ボルテックスしてください。
13. チューブをボルテックスミキサーから取り外し、軽く遠心してください。
14. 室温で **10 分間** インキュベートしてください。インキュベーション中に直ちに次のステップへ進んでください。



注記: このインキュベーション時間は、最大で 5 分（合計 15 分まで）延長しても、性能に悪影響を与えることはありません。

15. ● Streptavidin Beads を完全に混ざるまでボルテックスし、処理するライセートの数に応じて、適切な量の● Streptavidin Beads を新しい 1.5 mL チューブに、以下の通り加えてください:

処理するライセートの数	1	16
● Streptavidin Beads	44 μL	704 μL

16. 溶液が透明になるまで（約 2 分間）、チューブを 1.5 mL チューブ用の magnetic rack に置いてください。
17. 上清を除去し、廃棄してください。

18. チューブを magnetic rack から外し、下表の通り適切な量の○Bead Wash Buffer でビーズペレットを完全に再懸濁してください:

処理するライセートの数	1	16
○ Bead Wash Buffer	50 μ L	800 μ L



注記: 1.5 mL チューブの側面にビーズが付着していないことを確認してください。

19. 溶液が透明になるまで（約 2 分間）、チューブを 1.5 mL チューブ用の magnetic rack に置いてください。

20. 上清を除去し、廃棄してください。

21. ステップ 18~20 を 2 回繰り返し、合計 3 回洗浄してください。

22. チューブを magnetic rack から外し、下表の通り適切な量の● Binding Buffer でペレットを完全に再懸濁した後、室温で保管してください。

処理するライセートの数	1	16
● Binding Buffer	55 μ L	880 μ L

23. 各ライセートチューブに、上記のように● Binding Buffer で懸濁した● Streptavidin Beads を 50 μ L 加えてください。

24. チューブを 96 ウエルの PCR チューブラックにセットし、しっかりと押し込んで固定してください。キャップが確実に閉まっていることを確認したうえで、ラックにフタをしてください。

25. ラックをプレートアダプター付きのボルテックスミキサーにセットし、押してしっかりと固定してください。出力 100% で **1 分間**ボルテックスしてください。

26. 出力 20%（約 800~1000 RPM）で、室温にて **30 分間**ボルテックスしてください。



注記: ビーズが十分に混合されていることを確認するため、インキュベーション開始から 10 分後にビーズが溶液中に分散しているかを確認してください。もし沈降している場合は、ビーズが分散されていることを保つようにボルテックスの回転速度を上げてください。

27. チューブをボルテックスミキサーから取り外します。

28. チューブをスタンダードタイプのボルテックスアダプターで軽くボルテックスし、ビーズがチューブの底に集まらないように注意して、軽く遠心してください。

29. チューブを Parse Biosciences magnetic rack の high magnet position にセットし、磁石が 0.2 mL チューブの上部に近づくように配置してください。溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。



重要! 作業を進める前に、上清が完全に透明であることを確認してください。上清中にビーズが残ったまま廃棄すると、1 細胞あたりに検出される転写産物や遺伝子数が減少する可能性があります。代表的な画像については、「重要なガイドライン」セクションの「Magnetic Racks と Bead Cleanups」を参照してください。

30. magnetic rack にチューブを載せたまま、上清を除去し、廃棄してください。

31. チューブを magnetic rack から取り外します。各ビーズペレットを **125 μ L** の○ Wash Buffer 1 で完全に再懸濁してください。

32. 室温で **1 分間** インキュベートします。

33. チューブを magnetic rack の high position に戻し、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。

34. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し、廃棄してください。

35. ステップ 31~34 を 1 回繰り返し、○ Wash Buffer 1 で合計 2 回の洗浄を行ってください。

36. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **125 μ L** の○ Wash Buffer 2 で完全に再懸濁してください。



注記: ○ Wash Buffer 2 は、cDNA 増幅前のオプションでの保存に使用できるように保存しておいてください。

37. 室温で **1 分間** インキュベートしてください。

38. 直ちに Section 2.2 に進んでください。

2.2. cDNA テンプレートスイッチ

追加の洗浄後、Template Switch Master Mix がキャプチャーされた cDNA に加えられます。テンプレートスイッチ反応により、cDNA の 5'末端にアダプターが付加されます。

テンプレートスイッチを行うには:

- 以下の試薬を集め、下記に記載の通りに取り扱ってください:

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
○ Wash Buffer 3	-20°C Reagents	1	解凍後、室温で保管。3回、転倒混和。
● Template Switch Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上に置く。3回、転倒混和し、使用前に軽く遠心。
● Template Switch Primer	-20°C Reagents	1	
● Template Switch Enzyme	-20°C Reagents	1	氷上で保管。使用前に軽く遠心。



注記: 作業を始める前に、● Template Switch Buffer に沈殿がないことを確認してください。

- 処理するサプライライブラリーの数に応じて、新しい 2 mL チューブに Template Switch Master Mix を以下のように調製してください。ピペッティングを 10 回行って混合し、氷上で保管してください。

TEMPLATE SWITCH MASTER MIX		
Number of Samples	1	16
● Template Switch Buffer	101.75 μL	1628 μL
● Template Switch Primer	2.75 μL	44 μL
● Template Switch Enzyme	5.5 μL	88 μL
Total	110	1760 μL

- Section 2.1 でキャプチャーした各 cDNA チューブを magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。
- チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。

- チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに○ Wash Buffer 3 を **125 µL** 加えてください。



重要! ○ Wash Buffer 3 は別のステップで使用するため、廃棄しないでください。

- 室温で **1 分間** インキュベートします。
- チューブを magnetic rack に載せたまま、○ Wash Buffer 3 を除去して廃棄してください。
- チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **100 µL** の Template Switch Master Mix で完全に再懸濁してください。



注記: Template Switch Master Mix は粘性が高いため、ビーズを完全に再懸濁するのに時間がかかる場合があります。

- ビーズがチューブの底に集まらないように注意して、軽く遠心してください。
- 室温で **30 分間** インキュベートします。
- P200 ピペットを **75 µL** に設定し、ピッティングを 5 回行って各ビーズペレットを完全に再懸濁してください。
- チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。

TEMPLATE SWITCH		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
60 min	70°C	100 µL
Step	Time	Temperature
1	60 min	42°C
2	Hold	4°C

- 直ちに Section 2.3 へ進んでください。あるいは、cDNA 増幅前にサンプルを保存する場合は、ステップ 14 に進んでください。
- チューブを magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。



注記: ビーズが沈降している場合は、再懸濁が必要です。

15. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去して廃棄してください。

16. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **125 µL** の Wash Buffer 2 で完全に再懸濁してください。

 Safe stopping point: テンプレートスイッチされた cDNA は、4°Cで最大 18 時間まで保存可能です。凍結しないでください。

2.3. cDNA 増幅

キャプチャーされた cDNA は洗浄され、Template Switch Primer および Illumina TruSeq Read 2 特異的プライマーを用いて増幅されます。

cDNA を増幅するには:

1. 以下の試薬を集め、下記に記載の通りに取り扱ってください:

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
● cDNA Amp Mix	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上に置く。3回、転倒混和し、使用前に軽く遠心する。
● cDNA Amp Primers	-20°C Reagents	1	

2. 新しい 2 mL チューブに、cDNA Amplification Master Mix を以下のように調製してください。ピッティングを 10 回行って混合し、氷上で保管してください。

cDNA AMPLIFICATION MASTER MIX		
サブライブラリー数	1	16
● cDNA Amp Mix	60.5 µL	968 µL
● cDNA Amp Primers	60.5 µL	968 µL
Total	121 µL	1936 µL

3. Section 2.2 でテンプレートスイッチされた cDNA の各チューブを、Parse Biosciences magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。



注記: ビーズが沈降している場合は、適切に分離されるように、ピッティングでミックスして再懸濁する必要があります。

4. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。
5. チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに○ Wash Buffer 3 を **125 µL** 加えてください。
6. 室温で **1 分間**インキュベートします。
7. チューブを magnetic rack に載せたまま、○ Wash Buffer 3 を除去し廃棄してください。
8. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **100 µL** の cDNA Amplification Master Mix で完全に再懸濁してください。氷上で保管します。
9. 下記の表に基づき、cDNA 増幅に必要な PCR サイクル数を決定してください。これらの推奨値は多くの細胞種に適用できますが、サンプルの種類ごとに最適なサイクル数を調整する必要がある場合があります。

PCR サイクル数			
サプライラリー中の細胞/核数	RNA 量が多い細胞 (細胞株など)	RNA 量が少ない細胞 (PBMC など)	核
200-1,000	11	13	12
1,000-2,000	9	11	10
2,000-6,000	7	9	8
6,000-12,500	6	8	7
12,500-25,000	4	6	5
25,000-62,500	3	5	4

10. チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。

cDNA AMPLIFICATION			
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume	
50-70 min	105°C	100 µL	
Step	Time	Temperature	Cycles
1	3 min	95°C	1
2	20 sec	98°C	5
3*	45 sec	65°C*	
4	3 min	72°C	
5	20 sec	98°C	
6*	20 sec	67°C*	
7	3 min	72°C	変動あり (上記 参照)
8	5 min	72°C	
9	Hold	4°C	



重要! サプライブレーリーごとに細胞/核 数が異なる場合は、上記の推奨に従い、それぞれ別のサーマルサイクラーで増幅してください。



注記: アニーリングステップ 3*および 6*は、時間と温度設定が異なります。プログラムを開始する前に設定が正しいことを確認してください。



Safe stopping point: 増幅後の cDNA は 4°C で最大 18 時間まで保存可能です。

2.4. 増幅後の精製

増幅された cDNA は、0.8 倍の SPRI ビーズを用いたクリーンアップで精製されます。

cDNA を精製するには:

1. 増幅された cDNA チューブ 1 本につき、新たに調製した 85%エタノールを 400 μL 用意してください。
2. 室温に戻した SPRI ビーズを増幅済みの cDNA チューブ 1 本につき 80 μL 準備してください。



注記: SPRI ビーズは、少なくとも 30 分間室温に置いておく必要があります。

3. Section 2.3 で得られた各 cDNA チューブを、Parse Biosciences magnetic rack の high position にセットし、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。



注記: 2~3 分経っても溶液中にビーズが残っている場合は、P200 ピペットを 40 μL に設定し、PCR チューブの底を 3 回ピッティングして混和してください。その後、チューブを再び magnetic rack に戻し、溶液が透明になるまでインキュベートします。

4. チューブを magnetic rack に載せたまま、cDNA を含む上清 **90 μL** を新しい 0.2 mL チューブに移してください。室温で保管します。
5. SPRI ビーズが完全に混ざるまでボルテックスし、増幅された cDNA の各チューブに **72 μL** の SPRI ビーズを加えてください。
6. チューブを **5 秒間**ボルテックスした後、軽く遠心してください。
7. 室温で **5 分間**インキュベートします。
8. チューブを magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。
9. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。
10. チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに 85%エタノールを **180 μL** 加えてください。
11. 室温で **1 分間**インキュベートします。
12. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。
13. ステップ 10~12 をもう一度繰り返し、合計 2 回の洗浄を行ってください。残ったエタノールは P20 ピペットを使用して除去してください。

14. チューブを magnetic rack に載せたまま、SPRI ビーズを自然乾燥 (air dry) してください (約 2 分間)。



重要! ビーズを過度に乾燥させないでください。乾燥しすぎると、収量が大幅に低下する原因となります。ビーズに Cracking(ひび割れ)のような外観が見られる場合は、over-drying (過乾燥)のサインです。

15. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **25 μ L** の nuclease-free water で完全に再懸濁してください。

16. サーマルサイクラーで 37°C で **10 分間** インキュベートします。

17. チューブを magnetic rack の low position に置き、磁石が 0.2 mL チューブの底部に近くなるようにしてください。溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。



注記: magnetic rack の low position の画像については、「重要なガイドライン」セクションの「Magnetic Racks と Bead Cleanups」を参照してください。

18. チューブを magnetic rack に載せたまま、精製された cDNA を含む上清 **25 μ L** を新しい 0.2 mL チューブに移してください。氷上で保管します。



Safe stopping point: 増幅後の cDNA は、4°C で最大 48 時間、または -20°C で最大 3 か月間保存できます。保存しない場合は、速やかに Section 3 へ進んでください。

2.5. cDNA 定量

cDNA の濃度およびサイズ分布は、蛍光色素とキャピラリー電気泳動を用いて測定します。測定後、cDNA は 4°C で最大 48 時間、または -20°C で最大 3 か月間保存可能です。

cDNA を定量するには:

1. Section 2.4 で精製した各 cDNA の濃度を、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) アッセイキットを使用し、製造元の手順に従って測定してください。測定した濃度は Section 3 で使用します。
2. 精製した各 cDNA のサイズ分布を、Agilent Bioanalyzer システムの High Sensitivity DNA キット、または Agilent TapeStation システムの High Sensitivity D5000 ScreenTape および対応する試薬を用いて、製造元の手順に従って評価してください。

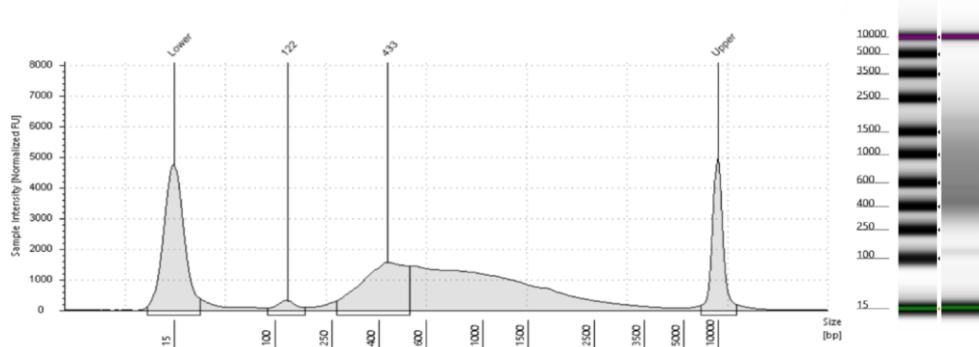


Figure 4: 増幅後に予想されるサプライブラリー cDNA のサイズ分布。TapeStation で解析されたヒト cDNA のトレース例

注記: サンプルは、製造元が推奨する濃度範囲に収まるように希釈が必要な場合があります。一般的には、1:3～1:10 の範囲での希釈が適切です。



注記: 上記のトレースは、TapeStation で得られる典型的な cDNA トレースの一例です。トレースの形状や明瞭さは、細胞種、サプライブラリーのサイズ、および TapeStation にロードされた DNA 量によって異なります。わずかなずれがあるサプライブラリーでも、高品質なデータを得ることが可能です。

Section 3: シーケンシングライブラリーの調製

3.1. 断片化およびエンドプレッップ

バーコード化と増幅された cDNA は、1 回の反応で、断片化とエンドプレッップされ A 末端が付加されます。

断片化およびエンドプレッップの準備:

1. サブライブラリーごとに、nuclease-free 水で調製した 85%エタノールを 1.2 mL 準備します。
2. サブライブラリーにつき 180 μ L の SPRI ビーズを室温に戻しておきます。
3. 発泡スチロールの保冷用ボックスなどの容器に氷を入れます。
4. 0.2 mL PCR チューブ用の Parse Biosciences magnetic rack を取り出します。
5. Section 2.5 で記録した cDNA 濃度を確認します。
6. 以下の試薬を集め、下記に記載された通りに取り扱ってください。

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
● Fragm/End Prep Buffer	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上に保管
● Fragm/End Prep Enzymes	-20°C Reagents	1	氷上に直接置き、使用前に軽く遠心

7. cDNA の入ったチューブを **5 秒間**ボルテックスし、その後軽く遠心してください。
8. 新しい 0.2 mL チューブに以下の通りに希釈した cDNA を調製し、全体積を 35 μ L にします。氷上で保存してください。残りの精製 cDNA は-20°Cで保存してください。

希釈した cDNA	
精製 cDNA	10 μ L
Nuclease-free water	25 μ L
Total Volume	35 μ L

9. サーマルサイクラーを使用前に十分に冷却するため、以下のプログラムを開始してください。

FRAGMENTATION AND END PREP		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
40 min	70°C	50 µL
Step	Time	Temperature
1	Hold*	4°C
2	10 min	32°C
3	30 min	65°C
4	Hold	4°C



注記: * この Hold ステップは、サーマルサイクラーを冷却し、ステップ 13 の実行準備が整っていることを確認するためのものです。

10. ● Fragm/End Prep Buffer を 5 秒間ボルテックスし、軽く遠心してください。



注記: ● Fragm/End Prep Buffer が完全に解凍されており、沈殿がないことを確認してください。

11. Fragmentation and End Prep Master Mix を、新しい 1.5 mL チューブに以下のように調製してください。ピッティングを 10 回行って混合し、氷上に保管します。

FRAGMENTATION AND END PREP MASTER MIX		
Number of Sublibraries	1	16
● Fragm/End Prep Buffer	5.5 µL	88 µL
● Fragm/End Prep Enzymes	11 µL	176 µL
Total	16.5 µL	264 µL

12. 希釈した cDNA の各チューブに 15 µL の Fragmentation and End Prep Master Mix を加えてください。P200 マルチチャンネルピペットを 40 µL に設定し、ピッティングを 10 回行って混合してください。軽く遠心します。

13. チューブを冷却済みのサーマルサイクラーにセットし、ステップ 1 の 4°C Hold をスキップして、FRAGMENTATION AND END PREP プログラムのステップ 2 へ進みます。



注記: チューブを入れる前に、サーマルサイクラーが 4°Cまで冷却されていることを確認してください。

14. プログラムがサーマルサイクルのステップ 4 (4°C) に到達したら、すぐにチューブを氷上に移し、直ちに Section 3.2 に進んでください。

3.2. 断片化およびエンドプレッピング後のサイズセレクション

断片化およびエンドプレッピングされた DNA は、double sided SPRI クリーンアップによってサイズセレクトされます。

断片化およびエンドプレッピングされた DNA をサイズセレクトするには:

1. 新たに調製した 85%エタノールを用意してください。
2. 室温に戻した SPRI ビーズを用意します (1 サプライブラリーあたり約 50 μ L)。



注記: SPRI ビーズは、少なくとも 30 分間室温に置いておく必要があります。

3. SPRI ビーズが完全に混ざるまでボルテックスし、断片化およびエンドプレッピングされた DNA の各チューブに **30 μ L** の SPRI ビーズを加えてください。
4. チューブを **5 秒間**ボルテックスし、軽く遠心してください。
5. 室温で **5 分間**インキュベートします。
6. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。
7. チューブを magnetic rack に載せたまま、断片化およびエンドプレッピングされた DNA を含む上清 **75 μ L** を新しい 0.2 mL チューブに移してください。ビーズペレットが残っているチューブは廃棄してください。
8. 各チューブに **10 μ L** の SPRI ビーズを加えてください。
9. チューブを **5 秒間**ボルテックスし、軽く遠心してください。
10. 室温で **5 分間**インキュベートします。

11. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 3 分間）



重要！ 作業を進める前に、溶液が完全に透明であることを確認してください。

12. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去して廃棄してください。

13. チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに 85%エタノールを **180 μ L** 加えてください。

14. 室温で **1 分間** インキュベートします。

15. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去して廃棄してください。

16. ステップ 13~15 をもう一度繰り返し、合計 2 回の洗浄を行ってください。残っているエタノールは、P20 ピペットを使って除去してください。

17. チューブを magnetic rack に載せたまま、SPRI ビーズを自然乾燥 (air dry)させます（約 30 秒間）。



重要！ ビーズを過剰に乾燥させないでください。回収率の大幅な低下につながる可能性があります。ビーズに Cracking(ひび割れ)が見られる場合は、over-drying (過乾燥)のサインです。

18. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **50 μ L** の nuclease-free water で完全に再懸濁してください。

19. 室温で **5 分間** インキュベートします。

20. チューブを magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします（約 2 分間）。

21. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清 **50 μ L** を新しい 0.2 mL チューブに移してください。



Safe stopping point: サイズセレクトされた断片化およびエンドプレップされた DNA は、4°Cで最大 18 時間、または-20°Cで最大 2 週間保存可能です。

3.3. アダプターライゲーション

Illumina TruSeq Read 1 配列を持つアダプターが、断片化およびエンドプレッピングされた DNA の 5'末端にライゲートされます。

アダプターをライゲートするには:

- 以下の試薬を集め、下記に記載のとおりに取り扱ってください。

ITEM	SOURCE	QTY	HANDLING AND STORAGE
● Ligation Adapter	-20°C Reagents	1	室温で解凍後、氷上に保管。3回転倒混和後、使用前に軽く遠心
● Adapter Ligation Buffer	-20°C Reagents	1	
● Library Amp Mix	-20°C Reagents	1	
UDI Plate - WT	-20°C Reagents	1 sealed well per sublibrary	室温で解凍後、氷上に保管
● Adapter Ligation Enzyme	-20°C Reagents	1	氷上に直接置き、使用前に軽く遠心

- Adapter Ligation Master Mix を新しい 1.5 mL チューブで以下の通り調製してください。ピッティングを 10 回行って混合し、氷上で保管します。

ADAPTER LIGATION MASTER MIX		
Number of Sublibraries	1	16
Nuclease-free water	19.25 µL	308 µL
● Adapter Ligation Buffer	22 µL	352 µL
● Adapter Ligation Enzyme	11 µL	176 µL
● Ligation Adapter	2.75 µL	44 µL
Total	55 µL	880 µL

- Section 3.2 で精製された断片化およびエンドプレッピングされた DNA の各チューブに、**50 µL** の Adapter Ligation Master Mix を加えてください。P200 マルチチャンネルピペットを 80 µL に設定し、ピッティングを 10 回行って混合します。その後、軽く遠心してください。

4. チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。

ADAPTER LIGATION		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	30°C*	100 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	20°C
2	Hold	4°C



注記: *サーマルサイクラーのフタが推奨温度の 30°C に達しない場合は、フタの加熱機能をオフにしてください。

5. プログラムが 4°C に到達したら、アダプターがライゲートされた DNA を氷上で保存し、ただちに Section 3.4 に進んでください。

3.4. ライゲーション後の精製

アダプターがライゲートされた DNA は、0.8 倍の SPRI ビーズクリーンアップによって精製されます。

ライゲートされた DNA を精製するには:

1. 新たに調製した 85%エタノールを用意します。
2. 室温に戻した SPRI ビーズを用意します (1 サブライブラリーあたり約 90 µL)。



注記: SPRI ビーズは、室温で少なくとも 30 分間、置いておく必要があります。

3. SPRI ビーズが完全に混ざるまでボルテックスし、Section 3.3 で作成したアダプターがライゲートされた DNA の各チューブに **80 µL** の SPRI ビーズを加えてください。
4. チューブを **5 秒間**ボルテックスし、軽く遠心してください。
5. 室温で **5 分間**インキュベートします。
6. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。
7. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。

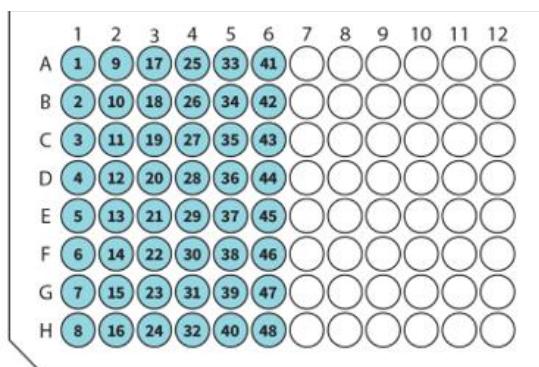
8. チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに 85%エタノールを **180 μ L** 加えてください。
9. 室温で **1 分間**インキュベートします。
10. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去し廃棄してください。
11. ステップ 8~10 をもう一度繰り返し、合計 2 回の洗浄を行ってください。残っているエタノールは、P20 ピペットを使用して除去してください。
12. チューブを magnetic rack に載せたまま、SPRI ビーズを自然乾燥 (air dry)してください (約 2 分間)。
13. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **23 μ L** の nuclease-free water で 完全に再懸濁してください。
14. 室温で **5 分間**インキュベートします。
15. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の low position に置き、磁石がチューブの底部に近づくようにし、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。
16. チューブを magnetic rack に載せたまま、精製された adaptor ligated DNA を含む上清 **21 μ L** を正確に新しい 0.2 mL チューブに移してください。氷上で保存してください。
17. 直ちに Section 3.5 に進んでください。

3.5. バーコーディング Round 4

精製された adaptor ligated DNA は、Illumina TruSeq Read 1 および Read 2 プライマーで PCR 増幅されます。このインデックス PCR により、シーケンシングライブラリーが生成され、i5/i7 UDI が追加され第 4 の細胞バーコードとして機能します。

Round 4 のバーコードを追加するには:

1. UDI Plate - WT を $100 \times g$ で **1 分間** 遠心します。
2. プレート表面を 70% エタノールで拭き、乾燥させてください。
3. 下図のように、左下にノッチが来るように UDI Plate - WT を配置してください。処理する各サプライライブラリーごとに、未使用のウェルを 1 つ選択し、そのウェルの位置と番号を記録してください。



4. マルチチャンネル P20 を使用して、選択した UDI Plate - WT のウェルのシールを突き破ってください。
5. マルチチャンネル P20 と新しいチップを使用し、5 回ピッティングして混合した後、すぐに選択した UDI Plate - WT の未使用ウェルから **4 μ L** を、Section 3.4 の対応する adaptor ligated DNA のチューブに移してください。



重要! UDI Plate - WT の 1 つのウェルからのプライマーは、1 本の adaptor ligated DNA のチューブにのみ移してください。

6. UDI Plate - WT に未使用のウェルが残っている場合は、プレートを -20°C で保存してください。同じウェルは再使用しないでください。
7. 各チューブに ● Library Amp Mix を **25 μ L** 加えてください。P200 マルチチャンネルピペットを $25 \mu\text{L}$ に設定して 10 回ピッティングして混合してください。軽く遠心してください。

8. 断片化およびエンドプレップ反応に加えた cDNA の量に基づいて、インデックス PCR に必要なサイクル数を決定してください (Section 2.5 で記録した cDNA の濃度を参照してください)。

PCR サイクル数	
cDNA Input (ng)	PCR Cycles
10-24	13
25-49	12
50-99	11
100-299	10
300-999	8
1,000 or more	7

9. チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行してください。

INDEXING PCR			
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume	
~30 min	105°C	50 μL	
Step	Time	Temperature	Cycles
1	3 min	95°C	1
2	20 s	98°C	変動あり (上の表を 参照)
3	20 s	67°C	
4	1 min	72°C	
5	5 min	72°C	1
6	Hold	4°C	1



重要! cDNA 濃度が異なるサプライブラリーを処理する場合は、上記の推奨に従い、それぞれ別のサーマルサイクラーで増幅を行ってください。

 Safe stopping point: サイズセレクション前であれば、シーケンシングライブラリーは 4°C で最大 18 時間まで保存可能です。

3.6. バーコーディング Round 4 後のサイズセレクション

シーケンシングライブラリーは、double sided SPRI クリーンアップによってサイズセレクトされます。

シーケンシングライブラリーをサイズセレクトするには:

1. 新たに調製した 85%エタノールを用意します。
2. 室温に戻した SPRI ビーズを用意します (1 サブライブラリーあたり約 50 μ L)。



注記: SPRI ビーズは、少なくとも 30 分間室温で置いておく必要があります。

3. SPRI ビーズが完全に混ざるまでボルテックスし、各シーケンシングライブラリーチューブに **30 μ L** 加えます。
4. チューブを **5 秒間**ボルテックスし、軽く遠心します。
5. 室温で **5 分間**インキュベートします。
6. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。
7. チューブを magnetic rack に載せたまま、DNA を含む上清 **75 μ L** を新しい 0.2 mL チューブに移します。ビーズペレットが残ったチューブは廃棄してください。
8. 各チューブに SPRI ビーズを **10 μ L** 加えます。
9. チューブを **5 秒間**ボルテックスし、軽く遠心します。
10. 室温で **5 分間**インキュベートします。
11. チューブを 0.2 mL チューブ用の magnetic rack の high position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 3 分間)。



重要! ビーズの量が少ないため、溶液が透明になるまでに時間がかかることがあります。作業を進める前に、溶液が完全に透明になっていることを確認してください。

12. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去して廃棄してください。
13. チューブを magnetic rack に載せたまま、各チューブに 85%エタノールを **180 μ L** 加えてください。
14. 室温で **1 分間**インキュベートします。

15. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を除去して廃棄します。
16. ステップ 13~15 をもう一度繰り返し、合計 2 回洗浄を行ってください。残っているエタノールは P20 ピペットで除去してください。
17. チューブを magnetic rack に載せたまま、SPRI ビーズを自然乾燥 (air dry) します (約 30 秒間)。
18. チューブを magnetic rack から取り外し、各ビーズペレットを **20 μ L** の nuclease-free water で完全に再懸濁します。
19. 室温で **5 分間**インキュベートします。
20. チューブを magnetic rack の low position に置き、溶液が透明になるまでインキュベートします (約 2 分間)。
21. チューブを magnetic rack に載せたまま、上清を新しい 0.2 mL チューブに移します。氷上で保存してください。



Safe stopping point: シーケンシングライブラリーは-20°Cで最大 3 か月間保存可能です。

3.7. シーケンシングライブラリーの定量

シーケンシングライブラリーの濃度およびサイズ分布は、蛍光色素とキャピラリー電気泳動を用いて測定されます。シーケンシングライブラリーは -20°C で最大 3 か月間保存可能です。

シーケンシングライブラリーを定量するには:

1. Section 3.6 で得られた各精製済みシーケンシングライブラリーの濃度を、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) アッセイキットを使用し、製造元の手順に従って測定してください。
2. 精製した各シーケンシングライブラリーのサイズ分布を、Agilent Bioanalyzer システムの High Sensitivity DNA キット、または Agilent TapeStation システムの High Sensitivity D1000 ScreenTape および対応する試薬を用いて、製造元の手順に従って評価してください。

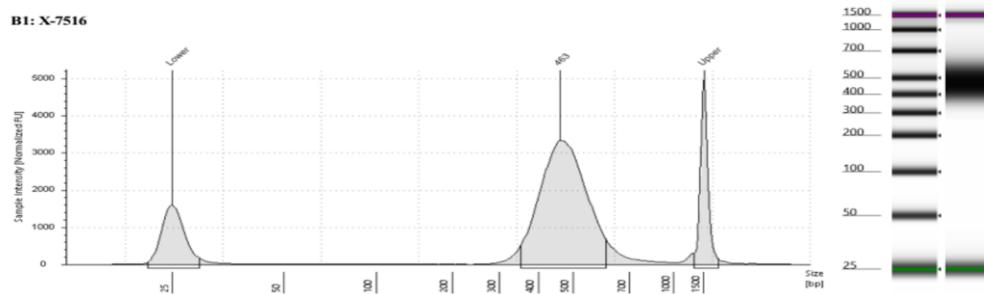


Figure 5: Illumina シーケンシング前に予想されるサイズ分布。TapeStation で解析された、インデックス付きサプライライブラリー由来のヒト DNA のトレースの一例

注記: サンプルは、製造元が推奨する濃度範囲に収まるように希釈が必要な場合があります。一般的には、1:3～1:10 の範囲で希釈するのが適切です。

 **注記:** 上記のトレースは、インデックス化されたサプライライブラリー由来の DNA を TapeStation で解析した際の代表的な例です。通常、400～500 bp の間にピークが確認されます。トレースの明瞭さは、TapeStation にロードされた DNA 量に依存します。わずかなずれがあるサプライライブラリーでも、高品質なデータを得ることが可能です。

注記: Bioanalyzer を使用した場合、追加のピークが検出されることがあります。これは通常、生成物が過剰に増幅された際に発生しますが、400～500 bp にピークが存在していれば、シーケンスやデータの品質には影響ないと考えられます。アンプリコンサイズを推定する際に、この追加のピークは使用しないでください。

付録

付録 A: Sublibrary Generation Table

この Sublibrary Generation Table は、Section 1.5 でターゲットとするサブライブラリー濃度を達成するためのサンプル希釈の指針を示しています。

Green text (top) : 各サブライブラリーに加える細胞懸濁液の体積 (ステップ 1.5.10 より)

Purple text (bottom) : 各サブライブラリーに加える Pre-Lysis Dilution Buffer の体積

Blue Shading : これは、サブライブラリーの細胞数を最適化するために、細胞ストックの段階希釈が必要であることを示しています。

Red Shading : これは、ターゲットとするサブライブラリーの細胞数に対して、細胞ストックの濃度が不足していることを示しています。

Stock con (cells/uL)	Target Sublibrary Cell Count (cells/sublibrary)													
	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	12,000	12,500	15,000	20,000	25,000	30,000	31,250	62,500
50	4	10	20											
	21	15	5											
100	2	5	10	20										
	23	20	15	5										
200	2.5	5	10	25										
	22.5	20	15	0										
400		2.5	5	12.5	25									
		22.5	20	12.5	0									
600			3.33	8.33	16.67	20	20.83	25						
			21.67	16.67	8.33	5	4.17	0						
800			2.5	6.25	12.5	15	15.63	18.75	25					
			22.5	18.75	12.5	10	9.37	6.25	0					
1,000			2	5	10	12	12.5	15	20	25				
			23	20	15	13	12.5	10	5	0				
1,200			4.17	8.33	10	10.42	12.5	16.67	20.83	25				
			20.83	16.67	15	14.58	12.5	8.33	4.17	0				
1,400			3.57	7.14	8.57	8.93	10.71	14.29	17.86	21.43	22.32			
			21.43	17.86	16.43	16.07	14.29	10.71	7.14	3.57	2.68			
1,600			3.13	6.25	7.5	7.81	9.38	12.5	15.63	18.75	19.53			
			21.87	18.75	17.5	17.19	15.63	12.5	9.38	6.25	5.47			
1,800			2.78	5.56	6.67	6.94	8.33	11.11	13.89	16.67	17.36			
			22.22	19.44	18.33	18.06	16.67	13.89	11.11	8.33	7.64			
2,000			2.5	5	6	6.25	7.5	10	12.5	15	15.63			
			22.5	20	19	18.75	17.5	15	12.5	10	9.38			
2,500			2	4	4.8	5	6	8	10	12	12.5	2.5		
			23	21	20.2	20	19	17	15	13	12.5	0		
3,000			3.33	4	4.17	5	6.67	8.33	10	10.42	20.83			
			21.67	21	20.83	20	18.33	16.67	15	14.58	4.17			
3,500			2.86	3.43	3.57	4.29	5.71	7.14	8.57	8.93	17.86			
			22.14	21.57	21.43	20.71	19.29	17.86	16.43	16.07	7.14			
4,000			2.5	3	3.13	3.75	5	6.25	7.5	7.81	15.63			
			22.5	22	21.88	21.25	20	18.75	17.5	17.19	9.38			
4,500			2.22	2.67	2.78	3.33	4.44	5.56	6.67	6.94	13.89			
			22.78	22.33	22.22	21.67	20.56	19.44	18.33	18.06	11.11			
5,000			2	2.4	2.5	3	4	5	6	6.25	12.5			
			23	22.6	22.5	22	21	20	19	18.75	12.5			
5,500			2.18	2.27	2.73	3.64	4.55	5.45	5.68	11.36				
			22.82	22.73	22.27	21.36	20.45	19.55	19.32	13.64				
6,000			2	2.08	2.5	3.33	4.17	5	5.21	10.42				
			23	22.92	22.5	21.67	20.83	20	19.79	14.58				
7,000					2.14	2.86	3.57	4.29	4.46	8.93				
					22.86	22.14	21.43	20.71	20.54	16.07				
8,000						2.5	3.13	3.75	3.91	7.81				
						22.5	21.88	21.25	21.09	17.19				
9,000						2.22	2.78	3.33	3.47	6.94				
						22.78	22.22	21.67	21.53	18.06				
10,000						2	2.5	3	3.13	6.25				
						23	22.5	22	21.88	18.75				

付録 B : シーケンシング情報

whole transcriptome libraries には、1 細胞あたり最低 20,000 リードのシーケンシングデプスを推奨します。ただし、理想的なシーケンシングデプスは、サンプルの種類や実験目的によって異なります。たとえば、異種性のある集団内の希少な細胞タイプを検出しようとする場合は、より深いシーケンシングが必要です。一方で、均一な集団を解析する場合は、浅いシーケンシングでも適切な場合があります。

whole transcriptome sequencing libraries は、使用するシーケンシング機器に応じて、製造元の指示に従って希釈および変性処理を行う必要があります。 Illumina プラットフォームを使用する場合は、シーケンシングの品質を最適化するために、PhiX を 5% 添加することを強く推奨します。

以下に、最終的な whole transcriptome sequencing library 構造の詳細を示します。

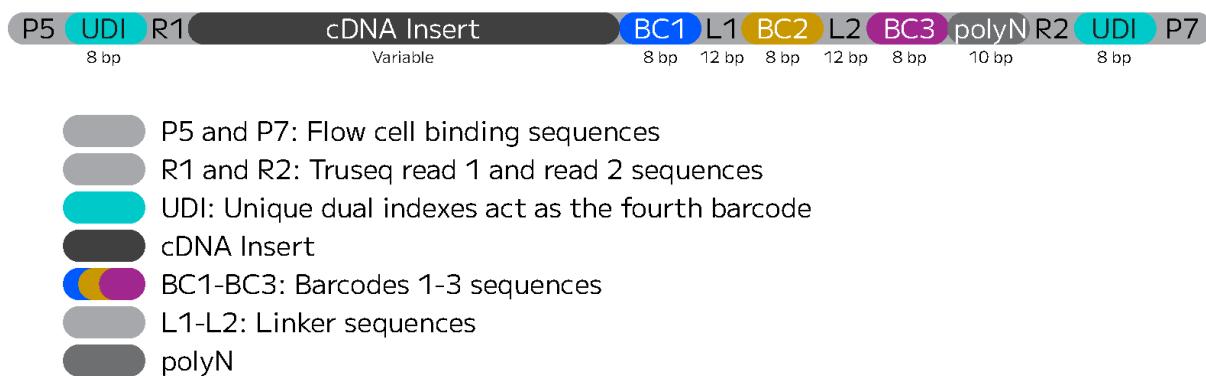


Figure 6: Whole transcriptome sequencing library の構造

ライブラリーは、下表に示すリード構成に従って、ペアエンドリードでシーケンスする必要があります。推奨されるリード長を超える読み取りでも使用可能ですが、Read 2 に含まれる過剰な塩基は Parse Analysis Pipeline によってトリミングされます。

READ	FUNCTION	INSERT
Read 1	cDNA Insert	64
i7 Index (Index 1)	Barcode 4 / UDI	8
i5 Index (Index 2)	Barcode 4 / UDI	8
Read 2	Barcodes 1-3	58

各サブライブラリーにタグ付けされる第4のバーコードは、標準的な Illumina i7 および i5 インデックスとして機能します。whole transcriptome libraries のデマルチプレックスには、以下の表を参照してください。

Sublibrary Index ID	Well Position	i7 Forward Sequence	i5 Reverse Complement Sequence	i5 Forward Sequence
UDI_Plate_WT_1	A1	CAGATCAC	ATGTGAAG	CTTCACAT
UDI_Plate_WT_2	B1	ACTGATAG	GTCCAACC	GGTTGGAC
UDI_Plate_WT_3	C1	GATCAGTC	AGAGTCAA	TTGACTCT
UDI_Plate_WT_4	D1	CTTGTAAAT	AGTTGGCT	AGCCAAC
UDI_Plate_WT_5	E1	AGTCAAGA	ATAAGGCG	CGCCTTAT
UDI_Plate_WT_6	F1	CCGTCCTA	CCGTACAG	CTGTACGG
UDI_Plate_WT_7	G1	GTAGAGTA	CATTCA	CATGAATG
UDI_Plate_WT_8	H1	GTCCGCCT	AGATACGG	CCGTATCT
UDI_Plate_WT_9	A2	GTGAAACT	TACAGACT	AGTCTGTA
UDI_Plate_WT_10	B2	TCATTCCT	AATGCC	CAGGCATT
UDI_Plate_WT_11	C2	GGTAGCAT	TGCTTG	GGCAAGCA
UDI_Plate_WT_12	D2	ACTTGATC	TTTGGGTG	CACCCAAA
UDI_Plate_WT_13	E2	ATGAGCAT	GAATCTGA	TCAGATT
UDI_Plate_WT_14	F2	GCGCTATC	CGACTGGA	TCCAGTCG
UDI_Plate_WT_15	G2	TGACCA	ACATTGGC	GCCAATGT
UDI_Plate_WT_16	H2	TATAATCA	ACCAC	ACAGTGGT
UDI_Plate_WT_17	A3	CAAAAGTC	CGGTTG	AACAACCG
UDI_Plate_WT_18	B3	CGATGTCA	CATGAGG	TCCTCATG
UDI_Plate_WT_19	C3	CTCAGAGT	TGGAGAGT	ACTCTCCA
UDI_Plate_WT_20	D3	TAATCGAC	TGACTTCG	CGAAGTCA
UDI_Plate_WT_21	E3	CATTTCT	GGAAGGAT	ATCCTTCC
UDI_Plate_WT_22	F3	CTATACTC	TGTTGAG	CTCGAAC
UDI_Plate_WT_23	G3	CACTCACA	AAGGCTGA	TCAGCCTT
UDI_Plate_WT_24	H3	CTCGAAC	CTCGAGT	CACTCGAG
UDI_Plate_WT_25	A4	CTCTATCG	ATCGGTG	CCACCGAT
UDI_Plate_WT_26	B4	TCCTCATG	AGGTCTT	CAAGACCT
UDI_Plate_WT_27	C4	AACAACCG	AGGAAGCG	CGCTTCCT
UDI_Plate_WT_28	D4	GCCAATGT	ACATGTG	ACACATGT
UDI_Plate_WT_29	E4	TGGTTGTT	ATACAGTT	AACTGTAT
UDI_Plate_WT_30	F4	TCTGCTGT	ATCGCCTT	AAGGCGAT
UDI_Plate_WT_31	G4	TTGGAGGT	TTCGACGC	GCGTCGAA
UDI_Plate_WT_32	H4	TCGAGCGT	TGTCGTT	GAACGACA
UDI_Plate_WT_33	A5	TGCGATCT	TCCATAGC	GCTATGGA

Sublibrary Index ID	Well Position	i7 Forward Sequence	i5 Reverse Complement Sequence	i5 Forward Sequence
UDI_Plate_WT_34	B5	TTCCTGCT	TAAGTGTC	GACACTTA
UDI_Plate_WT_35	C5	TTCCATTG	CTGGCATA	TATGCCAG
UDI_Plate_WT_36	D5	TAACGCTG	CTGAGCCA	TGGCTCAG
UDI_Plate_WT_37	E5	TTGGTATG	CTCAATGA	TCATTGAG
UDI_Plate_WT_38	F5	TGAACTGG	CGCATAACA	TGTATGCG
UDI_Plate_WT_39	G5	TCCAGTCG	CCGAAGTA	TACTTCGG
UDI_Plate_WT_40	H5	TGTATGCG	CCAGTTCA	TGAACTGG
UDI_Plate_WT_41	A6	TGGCTCAG	CAGCGTTA	TAACGCTG
UDI_Plate_WT_42	B6	TATGCCAG	CAATGGAA	TTCCATTG
UDI_Plate_WT_43	C6	GGTTGGAC	ATCCTGTA	TACAGGAT
UDI_Plate_WT_44	D6	GACACTTA	AGCAGGAA	TTCCCTGCT
UDI_Plate_WT_45	E6	GAACGACA	ACGCTCGA	TCGAGCGT
UDI_Plate_WT_46	F6	AAGGCGAT	ACAGCAGA	TCTGCTGT
UDI_Plate_WT_47	G6	ATGCTTGA	ACAAGCTA	TAGCTTGT
UDI_Plate_WT_48	H6	AGTATCTG	CATCAAGT	ACTTGATG

付録 C : サーマルサイクリングプログラム

Section 1: *In Situ* 細胞/核バーコーディングサイクリング

THAW ROUND 1 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	26 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C

BARCODING ROUND 1				
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume		
40 min	70°C	40 µL		
Step	Time	Temperature	cycles	
1	10 min	50°C	1	
2	12 s	8°C	3	
3	45 s	15°C		
4	45 s	20°C		
5	30 s	30°C		
6	2 min	42°C		
7	3 min	50°C		
8	5 min	50°C	1	
9	Hold	4°C		Hold

THAW ROUND 2 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	10 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C

BARCODING ROUND 2		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	50°C	50 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	16°C
2	Hold	4°C

ROUND 2 STOP		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
5 min	50°C	60 µL
Step	Time	Temperature
1	5 min	16°C
2	Hold	4°C

THAW ROUND 3 PLATE		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
10 min	70°C	10 µL
Step	Time	Temperature
1	10 min	25°C
2	Hold	4°C

BARCODING ROUND 3		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	50°C	60 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	16°C
2	Hold	4°C

CELL/NUCLEI LYSIS		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	80°C	55 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	65°C
2	Hold	4°C

Section 2: cDNA キャプチャーおよび増幅

TEMPLATE SWITCH		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
60 min	70°C	100 µL
Step	Time	Temperature
1	60 min	42°C
2	Hold	4°C

cDNA AMPLIFICATION			
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume	
50-70 min	105°C	100 µL	
Step	Time	Temperature	Cycles
1	3 min	95°C	1
2	20 s	98°C	5
3	45 s	65°C	
4	3 min	72°C	
5	20 s	98°C	
6	20 s	67°C	Variable
7	3 min	72°C	
8	5 min	72°C	1
9	Hold	4°C	1

Section 3: シーケンシングライブラリーの調製

FRAGMENTATION AND END PREP		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
40 min	70°C	50 µL
Step	Time	Temperature
1	Hold	4°C
2	10 min	32°C
3	30 min	65°C
4	Hold	4°C

ADAPTER LIGATION		
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume
15 min	30°C	100 µL
Step	Time	Temperature
1	15 min	20°C
2	Hold	4°C

INDEXING PCR			
Run Time	Lid Temperature	Sample Volume	
~30 min	105°C	50 µL	
Step	Time	Temperature	Cycles
1	3 min	95°C	1
2	20 s	98°C	変動あり (Section 3.5 の表を 参照)
3	20 s	67°C	
4	1 min	72°C	
5	5 min	72°C	1
6	Hold	4°C	1

付録 D : 改訂履歴

Version	説明	日付
1.0	初回リリース	2024年2月
1.1	読みやすさの向上と言い回しの明確化	2024年3月
1.2	cDNA およびライブラリートレースの更新	2024年3月
1.3	体積 (1.5.8) および cDNA インプット (3.5.8) の更新	2024年4月
1.4	新しいボックス構成	2024年8月
1.5	Section 1.2.17 : Low Input fixation サンプルに対応するステップを追加	2024年11月



parsebiosciences.com

support@parsebiosciences.com

