

ラン間のサンプル持ち込みを最大限に防ぐための MiSeqのメンテナンス テンプレート洗浄のプロトコール

August 22, 2014



崎川 真里

イルミナ株式会社

アソシエイト テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

illumina®

本日のOutline

- ▶ **MiSeq ウォッシュプロトコール**
 - Maintenance Wash、 Standby Wash、 Post-Run Wash
- ▶ **ラン間のサンプルキャリーオーバー対策用ウォッシュプロトコール**
 - ご用意が必要なもの
 - 設定方法
 - プロトコールの実施方法





MiSeq 洗淨方法について

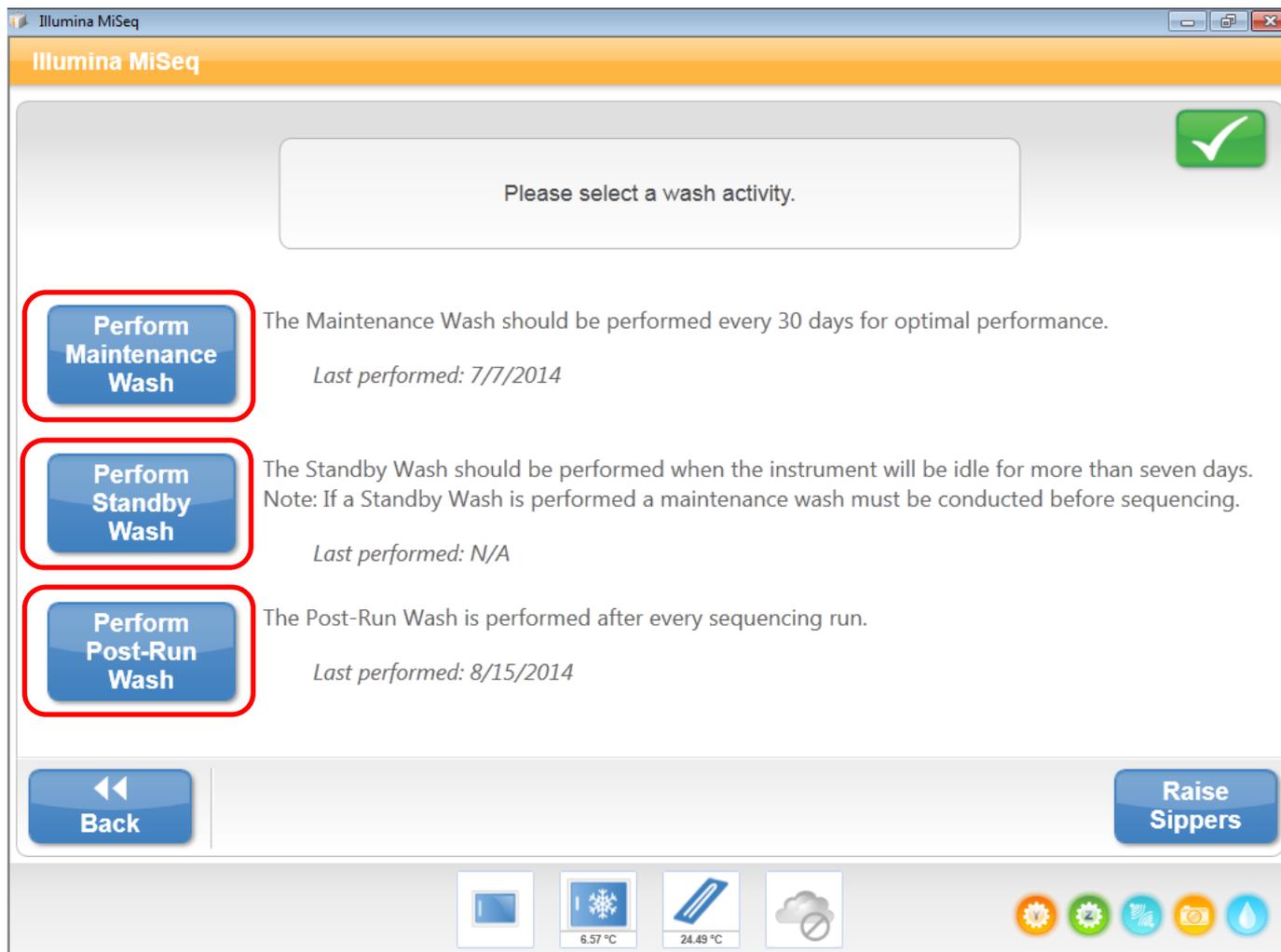
MiSeq 洗淨方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash



MiSeq 洗浄方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash



The screenshot shows the Illumina MiSeq software interface. At the top, there is a title bar with the text "Illumina MiSeq" and standard window controls. Below the title bar is a yellow header with the text "Illumina MiSeq". The main content area is light gray and contains a large white box with the text "Please select a wash activity." and a green checkmark icon in the top right corner. Below this box are three blue buttons with white text, each enclosed in a red rectangular border:

- Perform Maintenance Wash**: The Maintenance Wash should be performed every 30 days for optimal performance. *Last performed: 7/7/2014*
- Perform Standby Wash**: The Standby Wash should be performed when the instrument will be idle for more than seven days. Note: If a Standby Wash is performed a maintenance wash must be conducted before sequencing. *Last performed: N/A*
- Perform Post-Run Wash**: The Post-Run Wash is performed after every sequencing run. *Last performed: 8/15/2014*

At the bottom of the interface, there is a navigation bar with a "Back" button (left arrow) on the left and a "Raise Sippers" button on the right. Below the navigation bar is a status bar with several icons: a blue square, a snowflake icon with "6.57 °C", a pencil icon with "24.49 °C", a cloud icon, and a row of five circular icons (gear, play, leaf, camera, water drop).

MiSeq 洗淨方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash

0.5% Tween 20溶液 500mlを調製し、洗淨を行う。

使用済みフローセルとウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトルを使用。

▶ **Maintenance Wash**

- ・ 20分x3回のウォッシュ（2回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 月に1回実施する。

▶ **Standby Wash**

- ・ 60分x2回のウォッシュ（1回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 7日間以上装置を使用しない場合に実施する。
- ・ Standby Washを行うと、装置はStandby modeになる。
→次のラン前に必ずMaintenance Washを実施する必要がある。

▶ **Post-Run Wash**

- ・ 20分のウォッシュ（wash溶液の交換はない）

MiSeq 洗浄方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash

0.5% Tween 20を用い、洗浄を行う。

使用済みフローセルとウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトルを使用。

▶ **Maintenance Wash**

- 20分x3回のウォッシュ（2回のwash溶液交換をはさむ）
- 月に1回実施する。

▶ **Standby Wash**

- 60分x2回のウォッシュ（1回のwash溶液交換をはさむ）
- 7日間以上装置を使用しない場合に実施する。
- Standby Washを行うと、装置はStandby modeになる。
→次のラン前に必ずMaintenance Washを実施する必要がある。

▶ **Post-Run Wash**

- 20分のウォッシュ（wash溶液の交換はない）

MiSeq 洗浄方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash

0.5% Tween 20を用い、洗浄を行う。

使用済みフローセルとウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトルを使用。

▶ **Maintenance Wash**

- ・ 20分x3回のウォッシュ（2回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 月に1回実施する。

▶ **Standby Wash**

- ・ 60分x2回のウォッシュ（1回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 7日間以上装置を使用しない場合に実施する。
- ・ Standby Washを行うと、装置はStandby modeになる。
→次のラン前に必ずMaintenance Washを実施する必要がある。

▶ **Post-Run Wash**

- ・ 20分のウォッシュ（wash溶液の交換はない）

MiSeq 洗浄方法について

Maintenance Wash/Standby Wash/Post-Run Wash

0.5% Tween 20を用い、洗浄を行う。

使用済みフローセルとウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトルを使用。

▶ **Maintenance Wash**

- ・ 20分x3回のウォッシュ（2回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 月に1回実施する。

▶ **Standby Wash**

- ・ 60分x2回のウォッシュ（1回のwash溶液交換をはさむ）
- ・ 7日間以上装置を使用しない場合に実施する。
- ・ Standby Washを行うと、装置はStandby modeになる。
→次のラン前に必ずMaintenance Washを実施する必要がある。

▶ **Post-Run Wash**

- ・ 20分のウォッシュ（wash溶液の交換はない）



ラン間のサンプルキャリーオーバー 対策用ウォッシュプロトコル

サンプルキャリーオーバー対策用ウォッシュプロトコール

- ▶ ラン間のサンプルキャリーオーバー対策用のウォッシュプロトコールが作成されました。

Technical Support Note: Sequencing illumina®

Reducing Run-to-Run Carryover on the MiSeq Using Dilute Sodium Hypochlorite Solution

Run-to-Run Carryover

The MiSeq uses a fixed template loading fluidic pathway to load sequencing templates into the flow cell before a run. It is possible that low numbers of template molecules

サンプルをロードする17番ポートを重点的に洗浄するプロトコールです。

- ▶ 前ランからのサンプルキャリーオーバー
通常のMaintenance Wash 0.1%
 → 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いたWash **0.001%**
- ▶ 高感度のアプリケーションを利用するお客様を対象としています。

サンプルキャリーオーバー対策用ウォッシュプロトコール 洗浄のステップ

- ▶ 3番ポート（ウォッシュボトル）と17番ポート（ウォッシュカートリッジ）の切り替えでWashした後に、通常のPostRunWashに進む。所要時間30分程度。

3番ポート: 0.05% Tween20 1ml →廃棄

17番ポート: 次亜塩素酸ナトリウム溶液 1mL + 空気 →廃棄

3番ポート: 0.05% Tween20 1ml →廃棄

3番ポートから17番ポートへ: 0.05% Tween20 2ml 逆方向に流す

17番ポート: 0.05% Tween20 2ml + 空気 + 3番ポート: 0.05% Tween20 1ml →廃棄

3番ポートから17番ポートへ: 0.05% Tween20 2ml 逆方向に流す

17番ポート: 0.05% Tween20 2ml + 空気 + 3番ポート: 0.05% Tween20 1ml →廃棄

3番ポートから17番ポートへ: 0.05% Tween20 2ml 逆方向に流す

 通常のPostRun Washに進む

次亜塩素酸ナトリウム溶液は残りません。

ご用意が必要なもの

- ① MiSeq Template Wash実行用ファイル
レシピ(PostRunWash-carryover.xml)



- ② 洗浄用のチューブ
(PN: 15021932)



- ③ 次亜塩素酸ナトリウム (Sodium Hypochloride)

: 0.01%溶液 1mLを17番ポートに使用する。

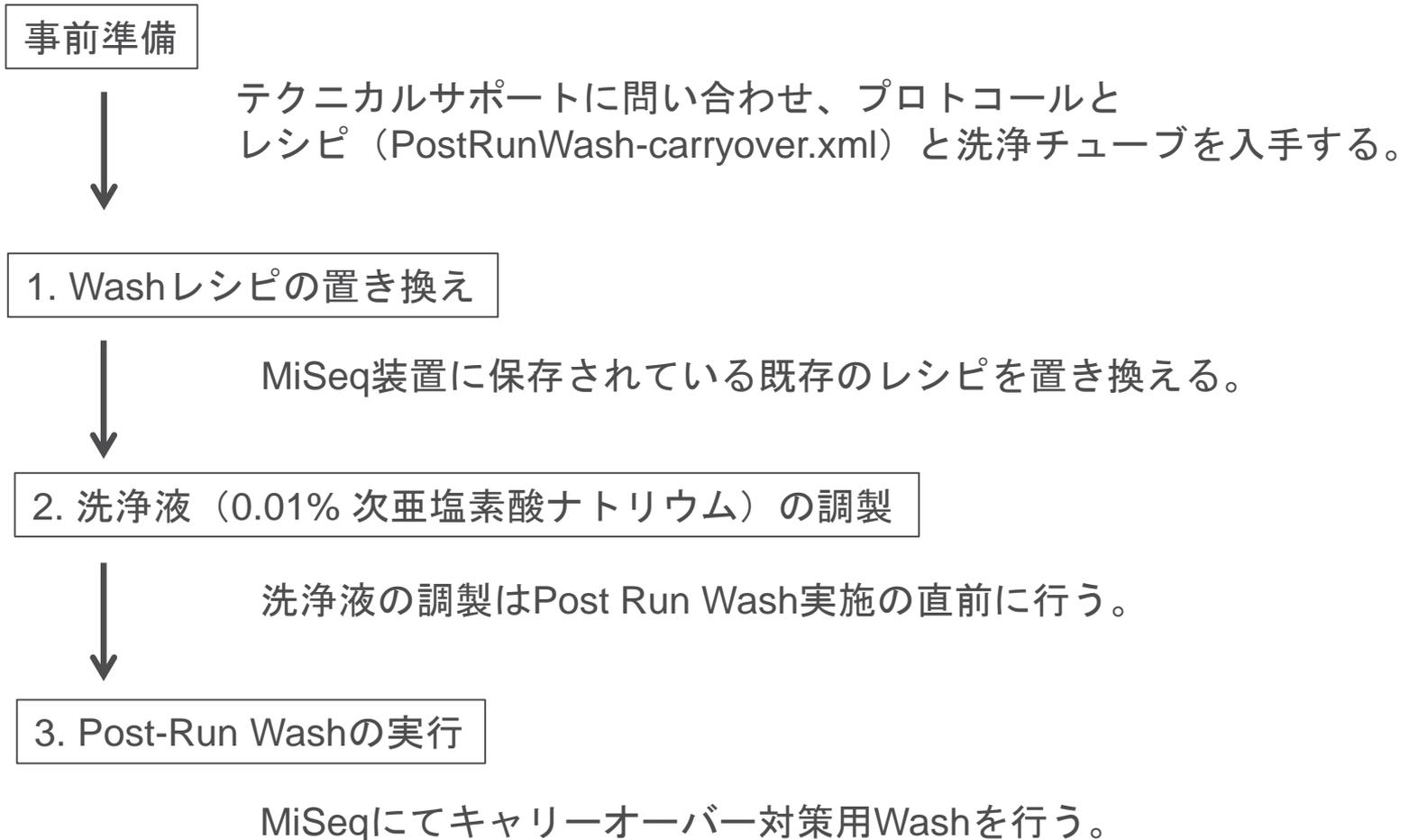
- ④ 0.5% Tween20溶液

: 17番以外のポートの洗浄に500mlを使用する。

テクニカルサポート
より送付

お客様ご負担

ウォッシュプロトコール実行までの流れ



ウォッシュプロトコール実行までの流れ

事前準備



テクニカルサポートに問い合わせ、プロトコールとレシピ（PostRunWash-carryover.xml）と洗浄用チューブを入手する。
techsupport@illumina.comにお問い合わせください。

1. Washレシピの置き換え



MiSeq装置に保存されている既存のレシピを置き換える。

2. 洗浄液（0.01% 次亜塩素酸ナトリウム）の調製



洗浄液の調製はPost Run Wash実施の直前に行う。

3. Post-Run Washの実行

MiSeqにてキャリーオーバー対策用Washを行う。

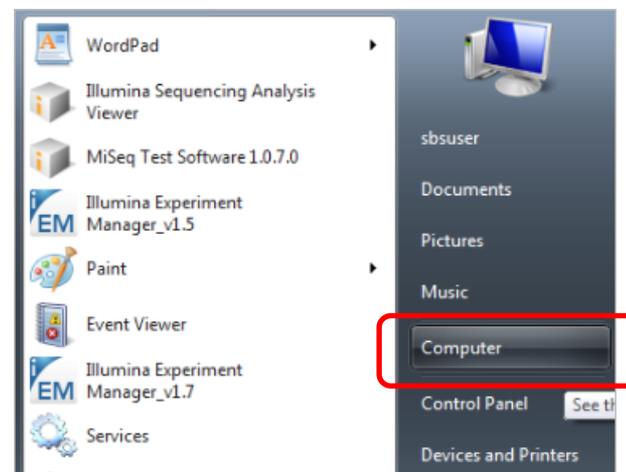
ウォッシュプロトコール実行までの流れ



1. Washレシピの置き換え

①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

C:¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe

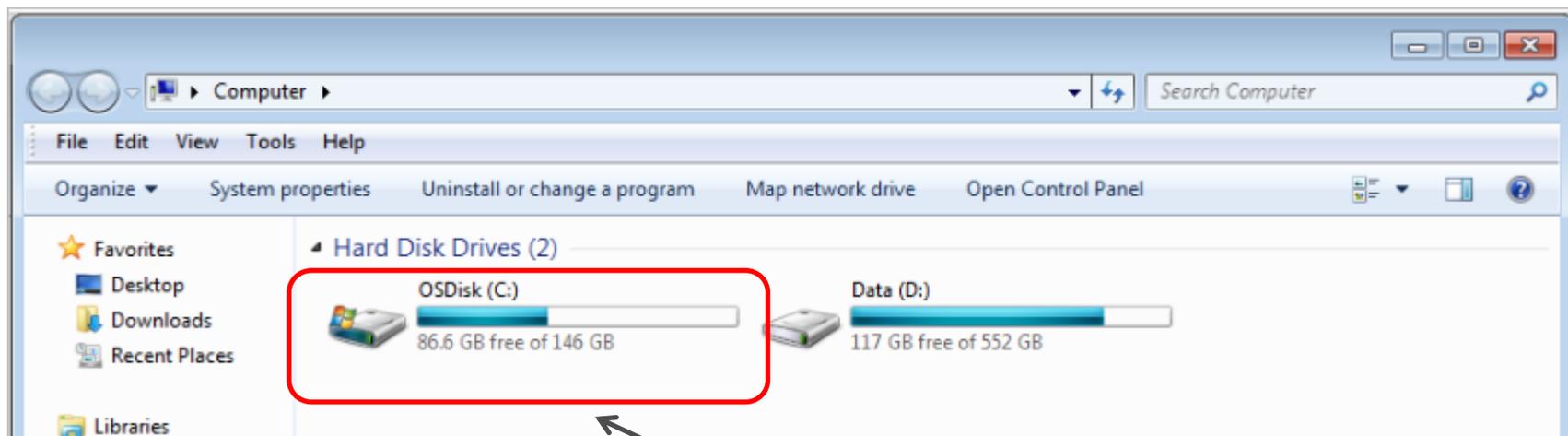


WindowsのStartを開き、
Computerを選択する

1. Washレシピの置き換え

①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

C:¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe

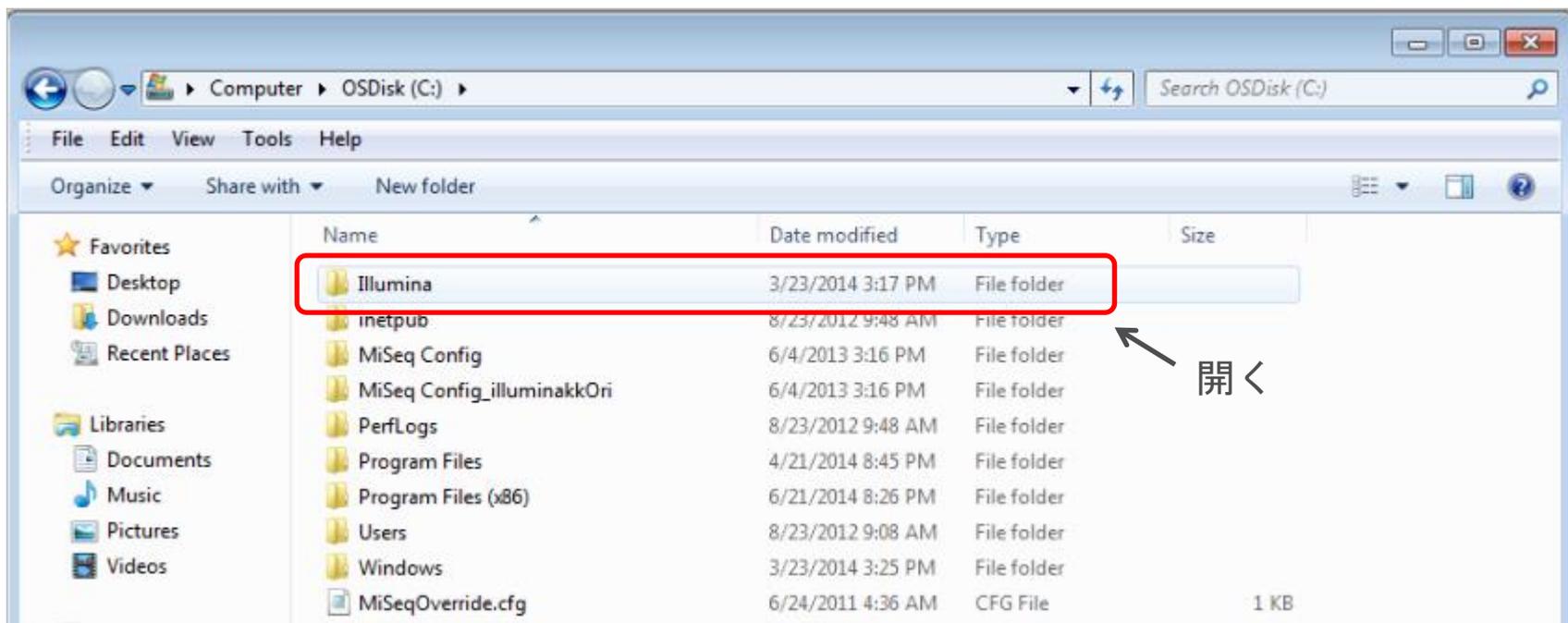


OSDisc(C:)を開く

1. Washレシピの置き換え

①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

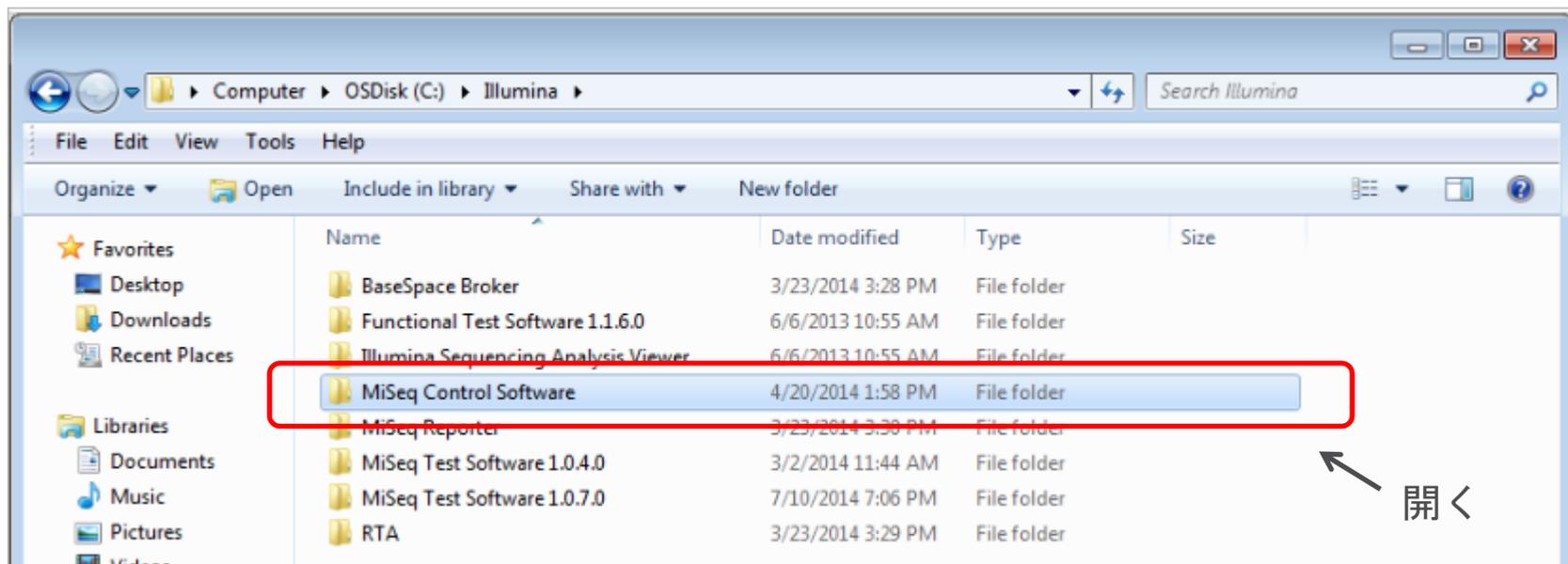
C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe



1. Washレシピの置き換え

①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

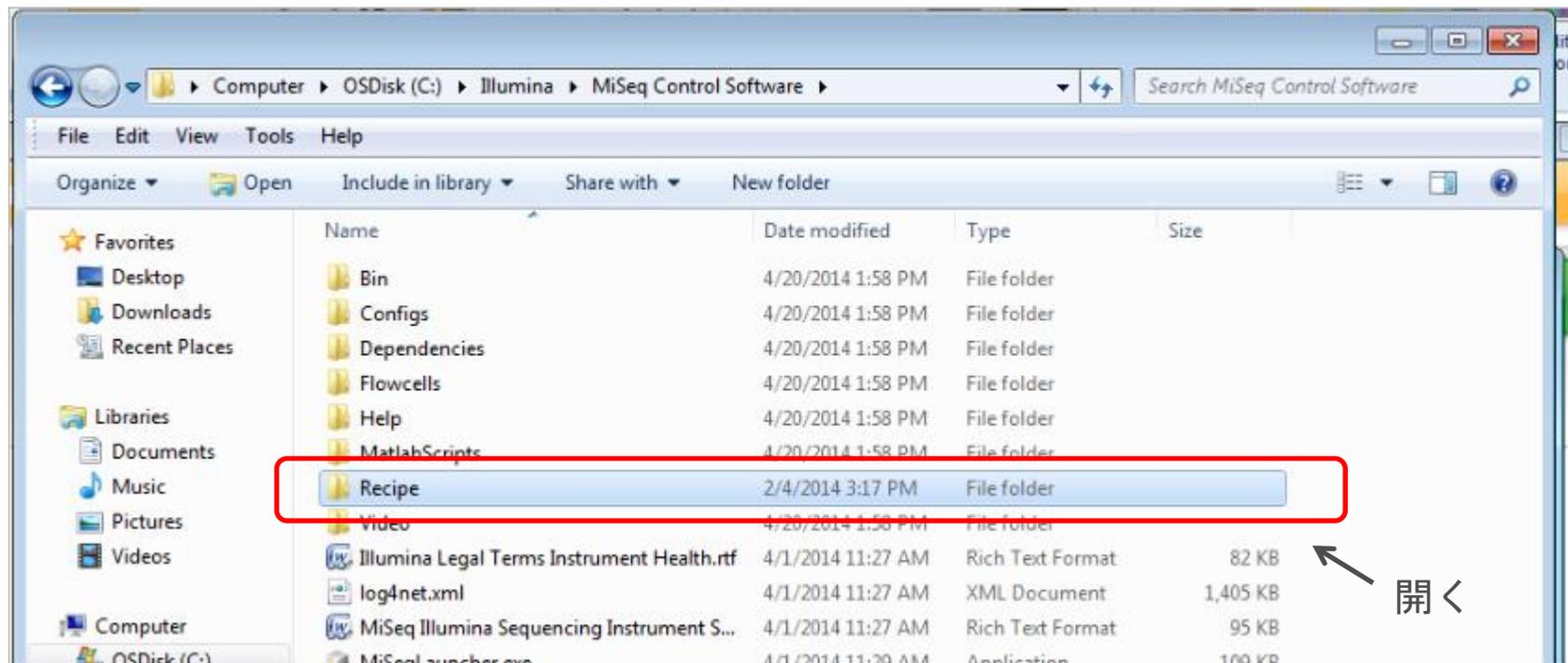
C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe



1. Washレシピの置き換え

①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe



1. Washレシピの置き換え

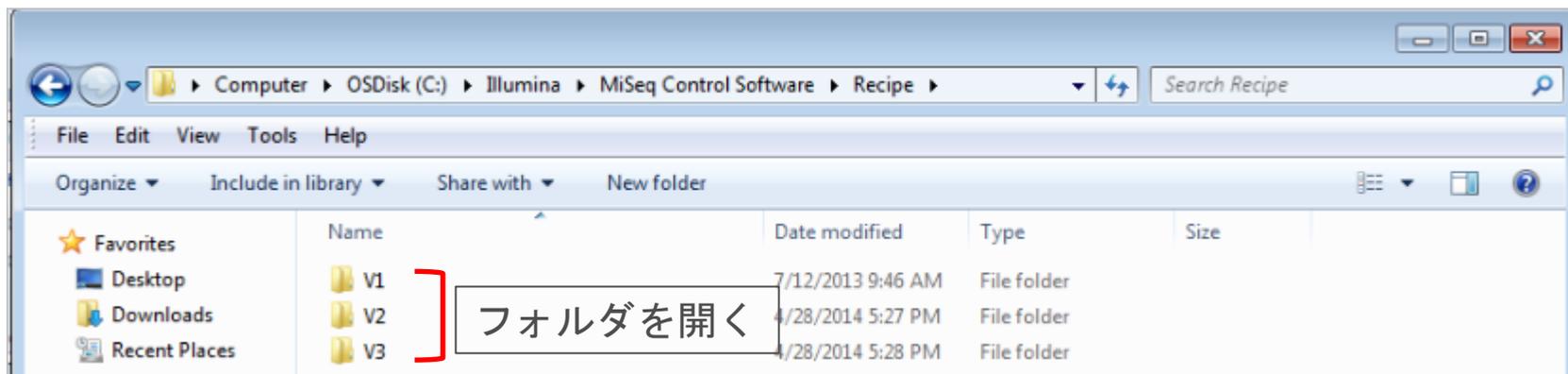
①MiSeq装置のレシピファイルが保存されている場所に入る。

C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe

Recipeフォルダ内にV1, V2, (MCS v2.3以降であれば) V3のフォルダがある。

キャリーオーバー対策の洗浄を実施する場合は、**V1~V3すべてのフォルダ内でファイルの置き換えを実施する。**

全てのフォルダで置き換えを実施しないと、流路に洗浄液が残りクラスター形成が阻害される場合がある。

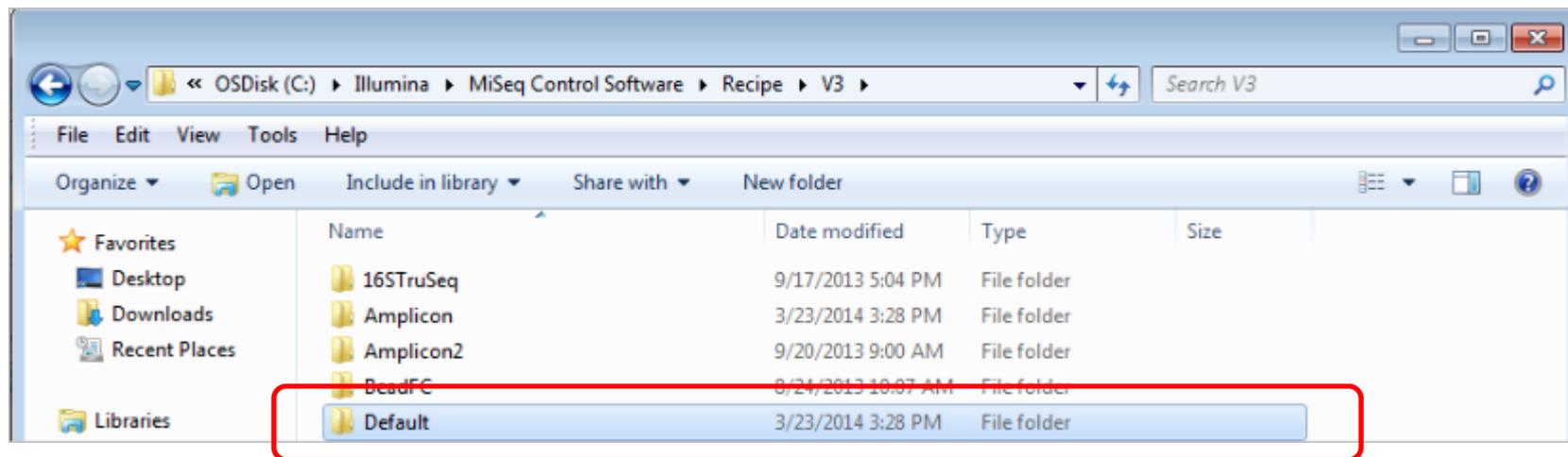


1. Washレシピの置き換え

②ファイルの置き換えを行う

C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe¥[V1~V3]¥Default¥Wash

Step 1. V1~V3の各フォルダ内にある、'Default'フォルダを開く。



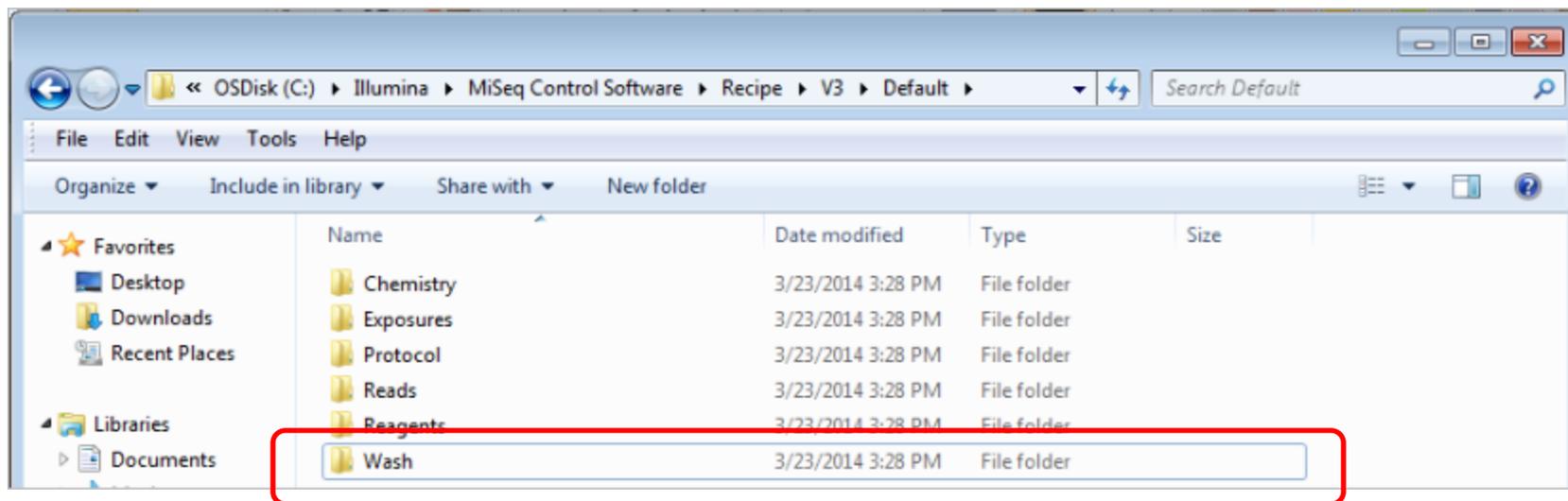
※装置の洗浄の内容は、このフォルダ内で制御している。

1. Washレシピの置き換え

②ファイルの置き換えを行う

C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe¥[V1~V3]¥Default¥Wash

Step 2. フォルダ内にある、'Wash'フォルダを開く。



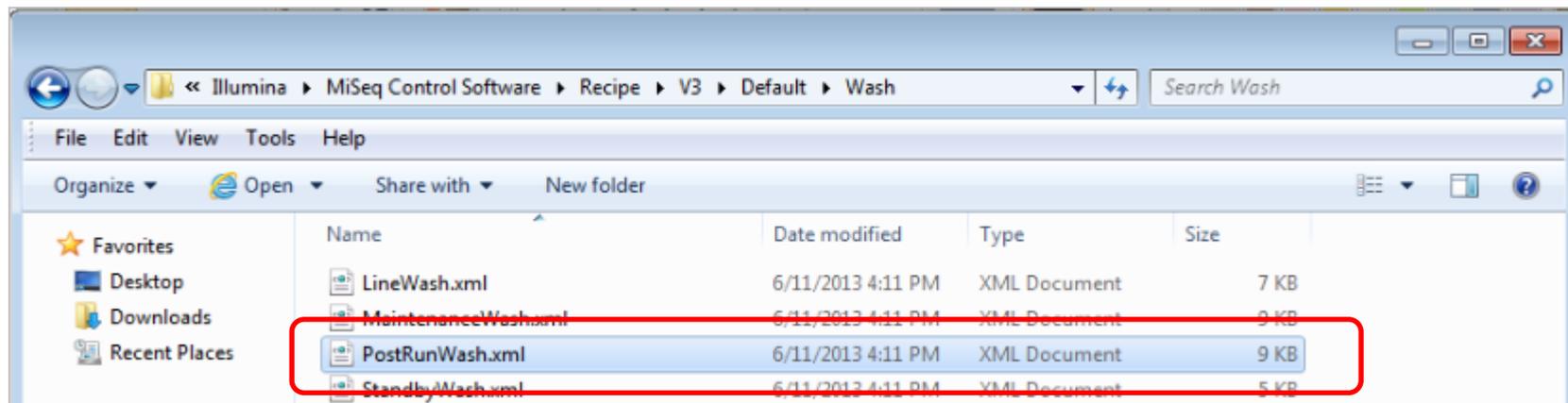
↑ 開く

1. Washレシピの置き換え

②ファイルの置き換えを行う

C:\illumina\MiSeq Control Software\Recipe\V3\Default\Wash

Step 3. 元のPostRunWash.xmlのファイル名を書き換える。



存在しているPostRunWash.xmlというファイル名を、
‘OriginalPostRunWash.xml’に変更する。

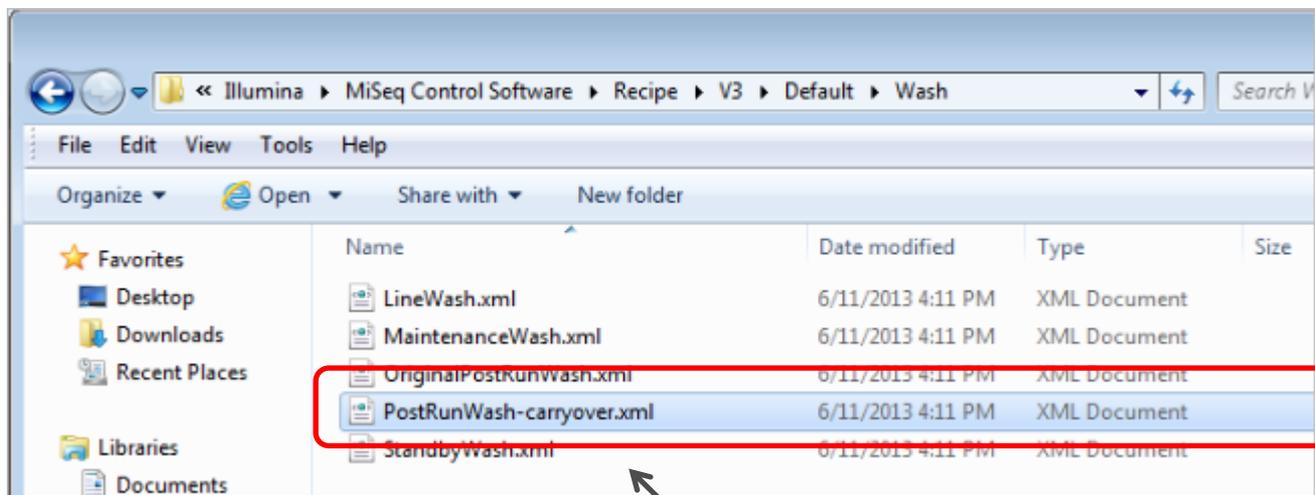
LineWash.xml	6/11/2013 4:11 PM	XML Document
MaintenanceWash.xml	6/11/2013 4:11 PM	XML Document
OriginalPostRunWash.xml	6/11/2013 4:11 PM	XML Document

1. Washレシピの置き換え

②ファイルの置き換えを行う

C:\¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe¥[V1~V3]¥Default¥Wash

Step 4. キャリーオーバー対策用レシピを置く。



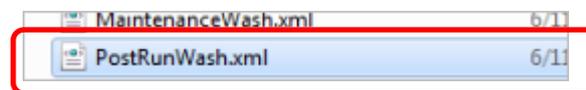
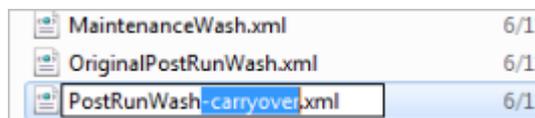
テクニカルサポートから受け取ったレシピを置く
PostRunWash-carryover.xml

1. Washレシピの置き換え

②ファイルの置き換えを行う

C:\illumina\MiSeq Control Software\Recipe\[V1~V3]\Default\Wash

Step 5. PostRunWash-carryover.xmlからPostRunWash.xmlへファイル名を変更する。



ファイルの名称を PostRunWash.xmlに変更

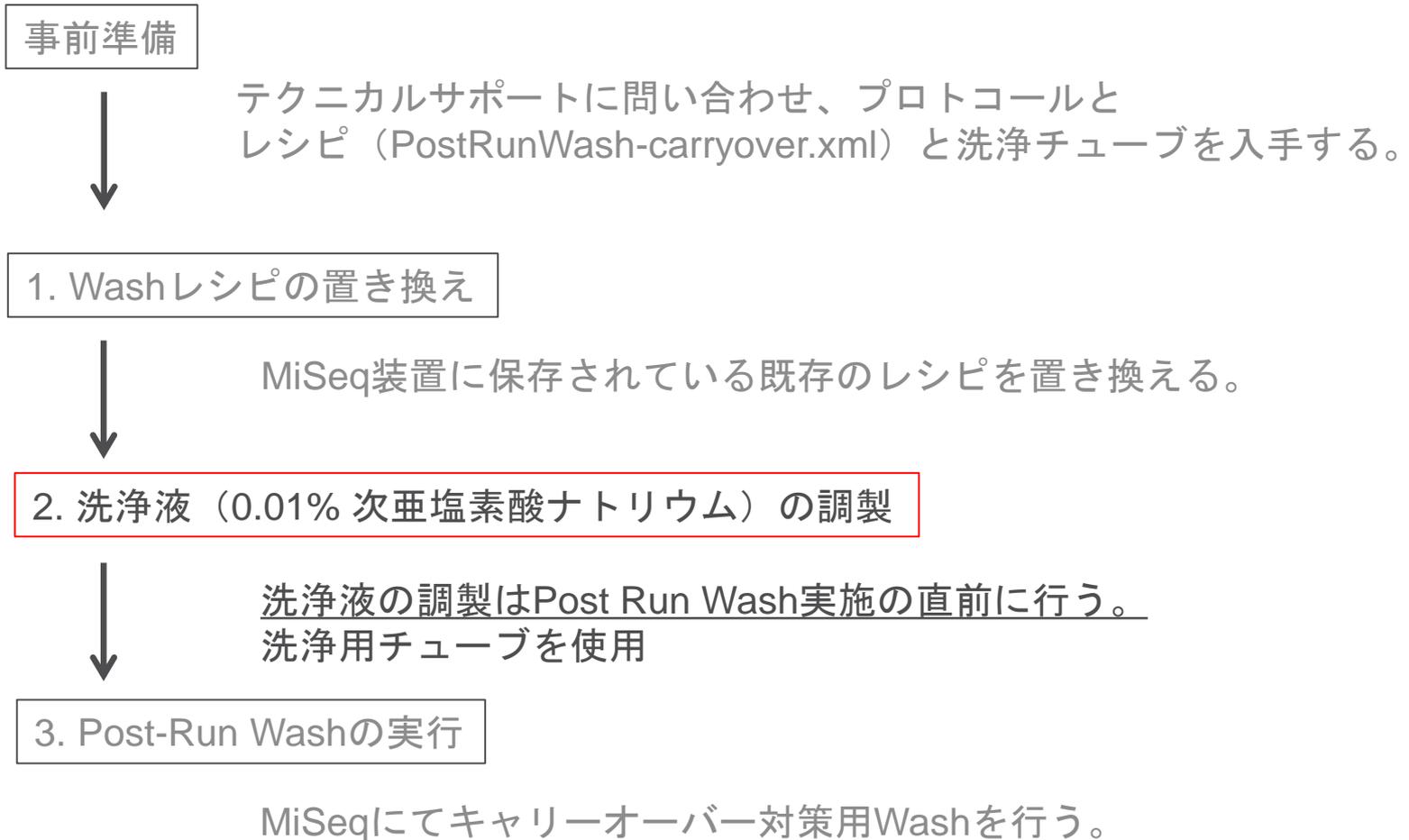
Step 6. Step1~5を繰り返し、V1~V3のすべてのフォルダも同様に行う。

 V1	7/12/2013 9:46 AM	File folder
 V2	4/28/2014 5:27 PM	File folder
 V3	4/28/2014 5:28 PM	File folder

各フォルダ内にある変更していないレシピをPostRunWash-carryover.xmlに置き換え、ファイル名をPostRunWash.xmlに変更する

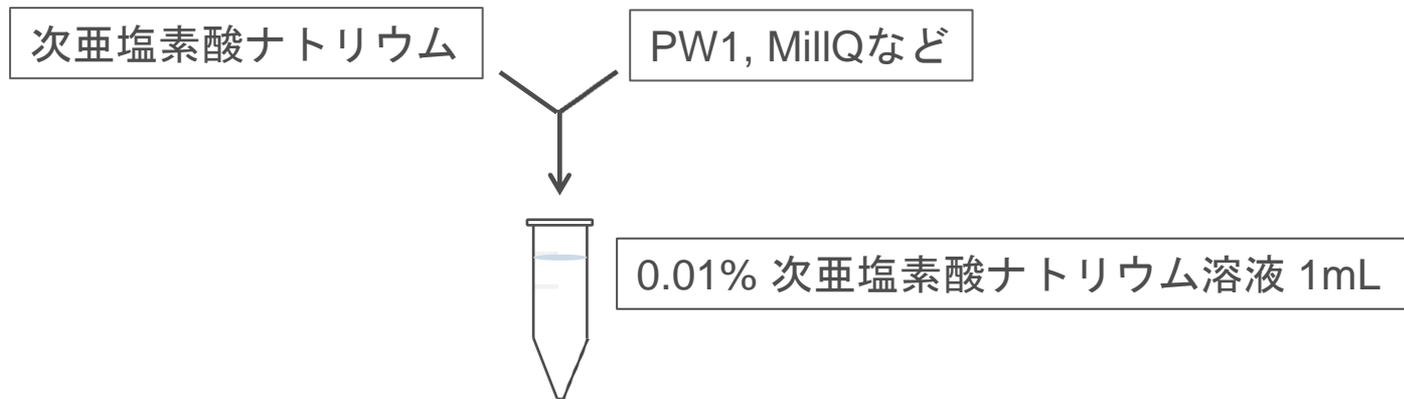
通常のPostRunWashがキャリーオーバー対策用Washレシピに置き換わります

ウォッシュプロトコール実行までの流れ



2. 洗浄液（0.01% 次亜塩素酸ナトリウム）の調製

- 1) 次亜塩素酸ナトリウム(Sodium Hypochlorite) をPW1やMilliQ水などで希釈し、0.01% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 1mLを調製する。



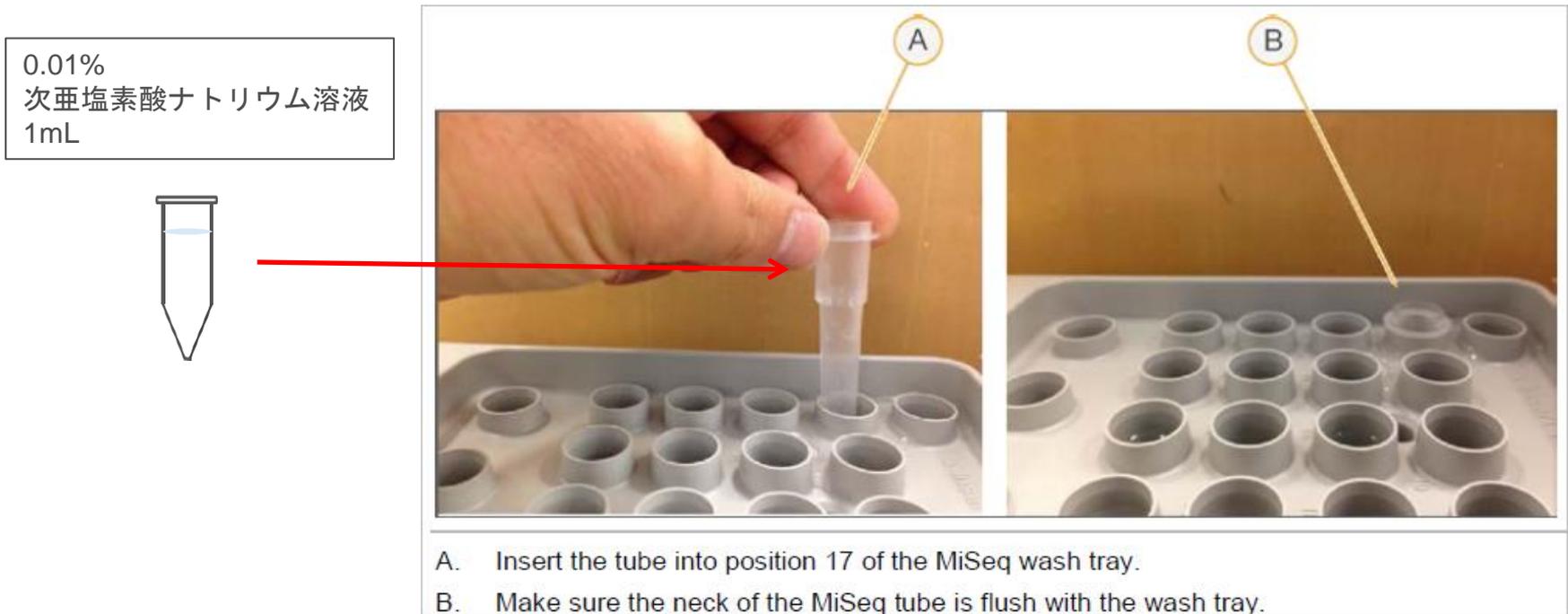
※市販のブリーチ剤から洗浄液の調製も可能（NaOHを含むブリーチ剤は不可）
米国本社の使用例 CLOROXブリーチ(6% Sodium Hypochlorite)を希釈して使用

<http://www.clorox.com/products/clorox-concentrated-regular-bleach/>

最終的に0.01% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 1mLを調製する。

2. 洗浄液（0.01% 次亜塩素酸ナトリウム）の調製

- 2) 調製した0.01%次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗浄用チューブに分注し、
MiSeqウォッシュカートリッジの17番ポートに差しこむ（下図）。



ウォッシュプロトコール実行までの流れ

事前準備

テクニカルサポートに問い合わせ、プロトコールとレシピ（PostRunWash-carryover.xml）と洗浄チューブを入手する。

1. Washレシピの置き換え

MiSeq装置に保存されている既存のレシピを置き換える。

2. 洗浄液（0.01% 次亜塩素酸ナトリウム）の調製

洗浄液の調製はPost Run Wash実施の直前に行う。

3. Post-Run Washの実行

MiSeqにてキャリーオーバー対策用Washを行う。
0.01% 次亜塩素酸ナトリウム溶液と0.5% Tween20溶液を準備する。

3. Post-Run Washの実行

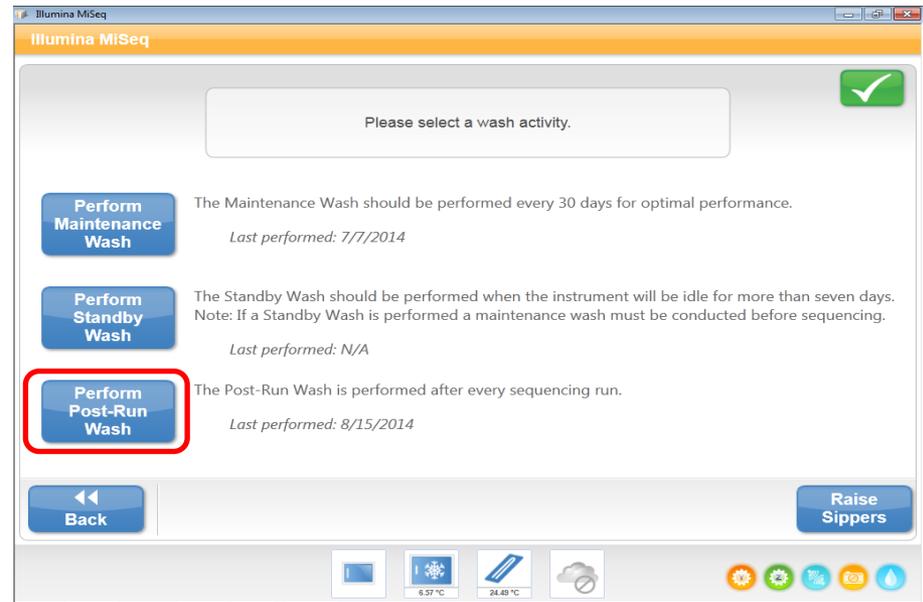
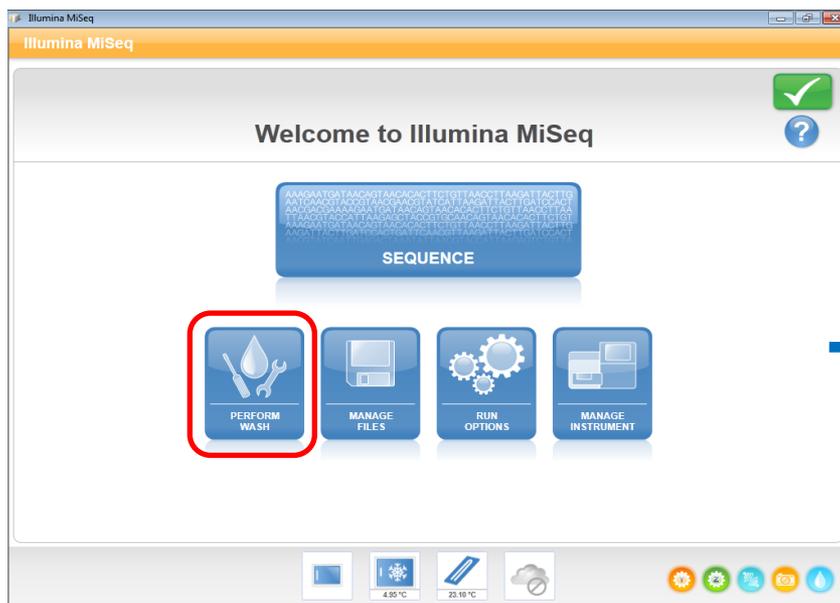
- ▶ Washレシピの置き換えと洗浄液の調製が完了したら、MiSeqでWashを行う。
- ▶ 以下のいずれかで、Post Run Washに進む。
 - ①Home画面 > PERFORM WASH > PostRun Wash
 - ②MiSeqのランが終了後 > PostRun Wash



3. Post-Run Washの実行

① Home画面 > PERFORM WASH > PostRun Wash

Home画面からPERFORM WASH > PostRun Washと進み、Washを開始する。

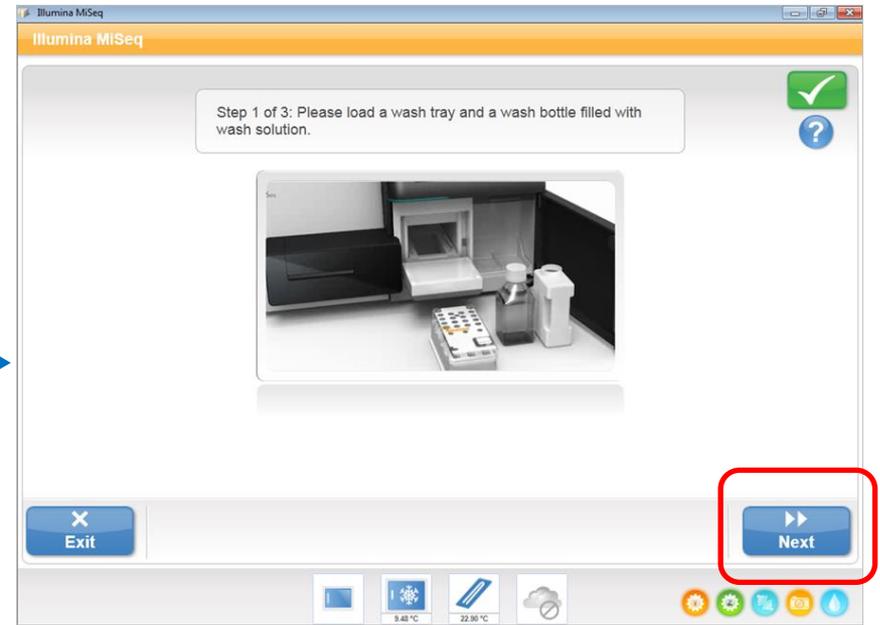
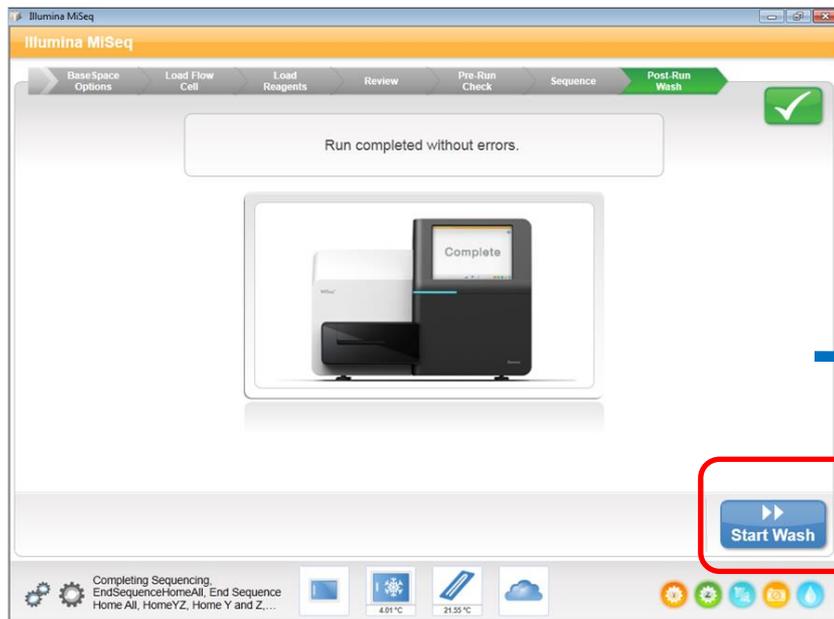


※PostRun Washのレシピがキャリーオーバー対策用Washレシピに置き換わっているため、ラン前のPostRun Washも次亜塩素酸ナトリウム溶液でのWashが適用される。

3. Post-Run Washの実行

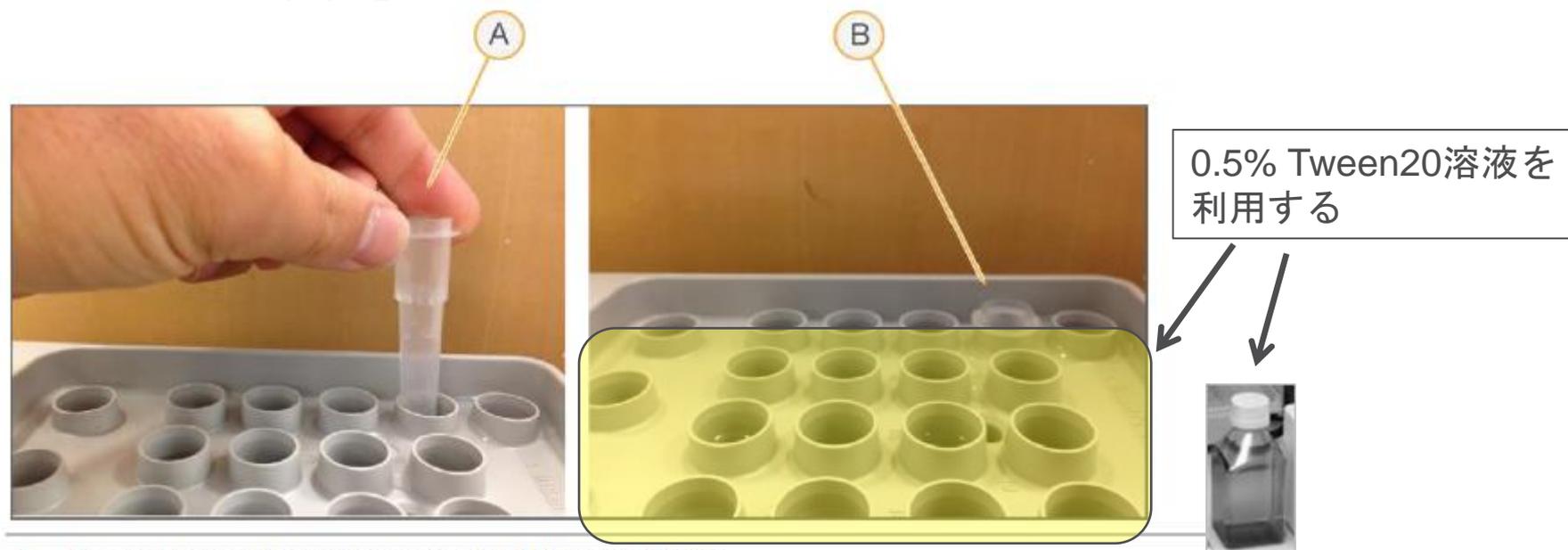
②MiSeqのランが終了後 > PostRun Wash

ラン終了後にStart Washを選択し、洗浄液の準備ができればWashを開始する。



3. Post-Run Washの実行

- ▶ キャリーオーバー対策用Washでは、0.01%次亜塩素酸ナトリウム溶液で17番ポートを洗浄した後に、通常のPostRun Washを行う。
- ▶ 17番ポート以外（1~16・18~22ポートおよびウォッシュボトル）には、0.5% Tween20溶液を満たす。

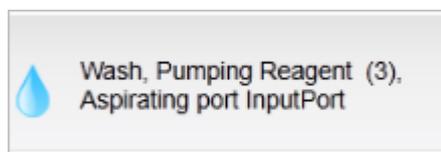
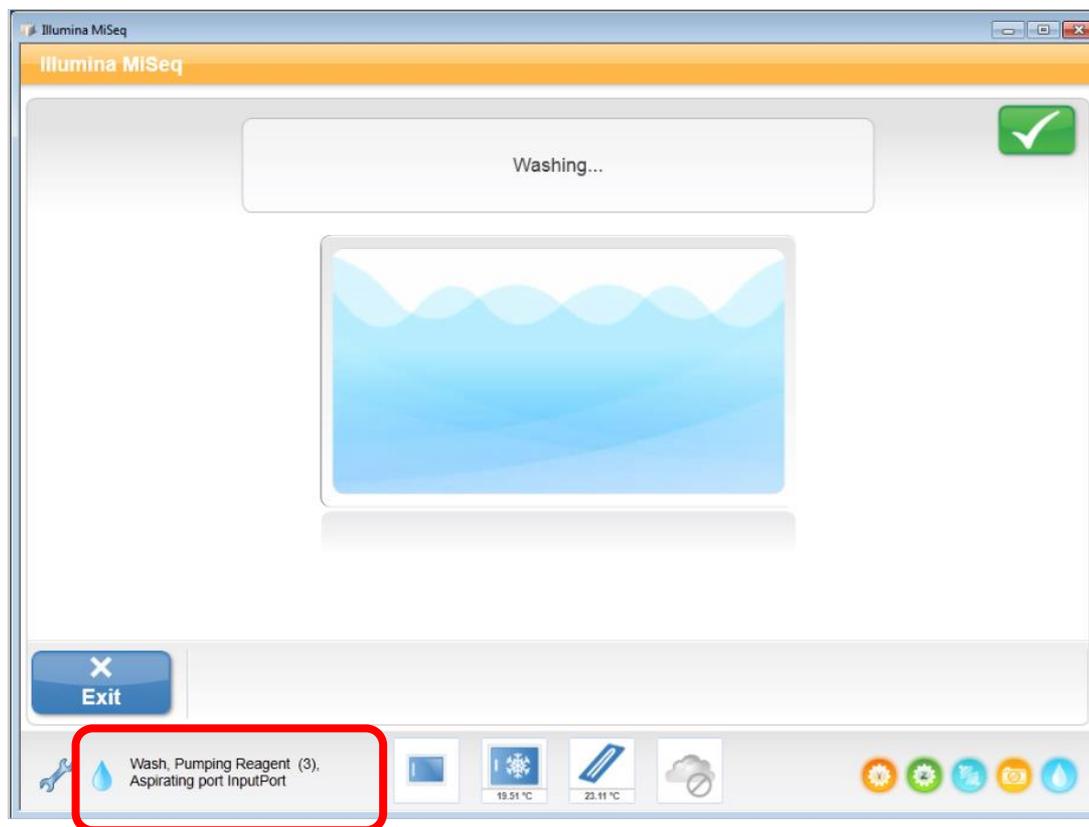


- A. Insert the tube into position 17 of the MiSeq wash tray.
B. Make sure the neck of the MiSeq tube is flush with the wash tray.

ウォッシュボトル

キャリーオーバー対策用Washを開始

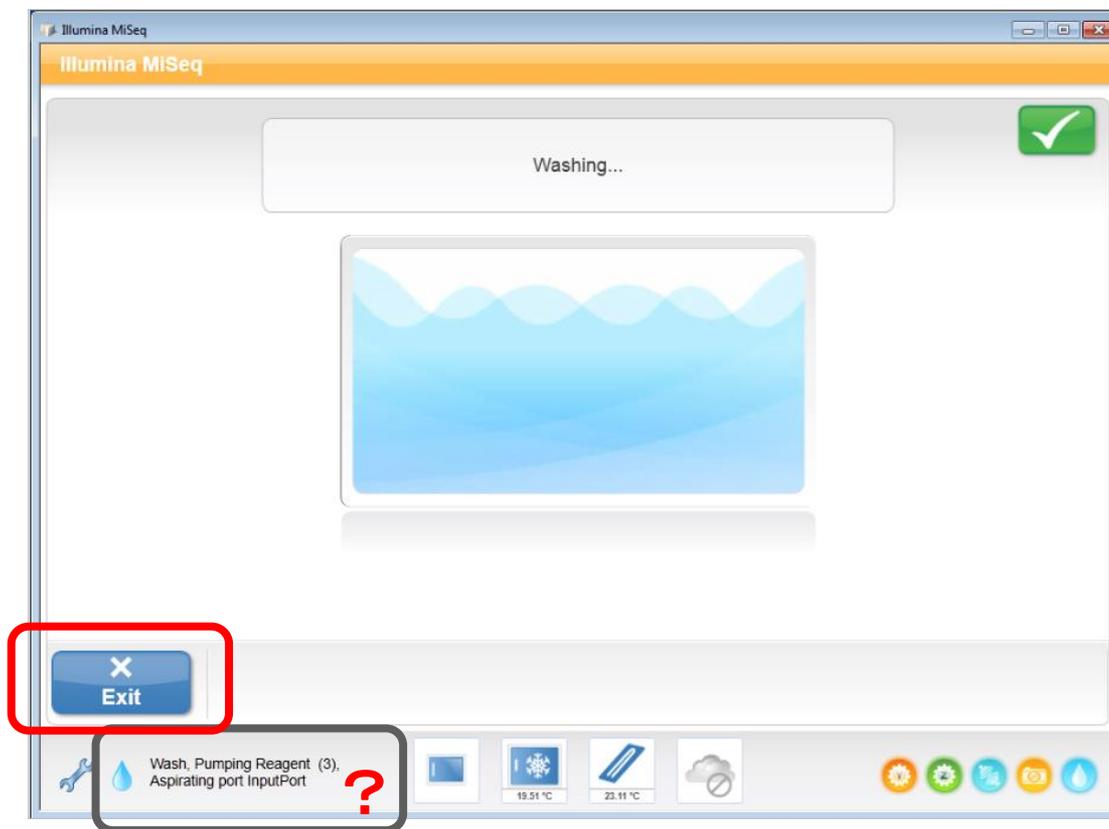
Wash画面の表示



3番ポート（ウォッシュボトル）
と17番ポートで複数回切り替わる
ことをご確認ください。

キャリーオーバー対策用Washを開始

Wash画面の表示



3番ポート以外から開始した場合、Washレシピの置き換えに問題がある可能性があります。

- ①Exitボタンで停止し、HOME画面からPostRun Washにお進みください。
- ②Washレシピが、C:\illumina\MiSeq Control Software\Recipe\[V1~V3]で、正常に置き換わっていることをご確認ください。

変更後の Wash プロトコールについて

- ▶ キャリーオーバー対策用Washレシピに置き換えると、すべてのPostRun Washに適用される。
- ▶ Maintenance Washと Standby Washは、これまで通りの内容で実施される。
- ▶ キャリーオーバー対策用Washが必要ないとき

◇Washレシピを置き換えたまま行う場合

①洗淨チューブをささずに17番ポートに0.5% Tween20を満たす。

②PostRun Washを実行する。

→次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用せずにPostRun Washが行われる。

◇PostRun Washの内容を初期の設定に戻したい場合

元のレシピに再度置き換える必要がございます。

レシピの置き換え時と同様に下記Washレシピの保存場所をご確認ください。

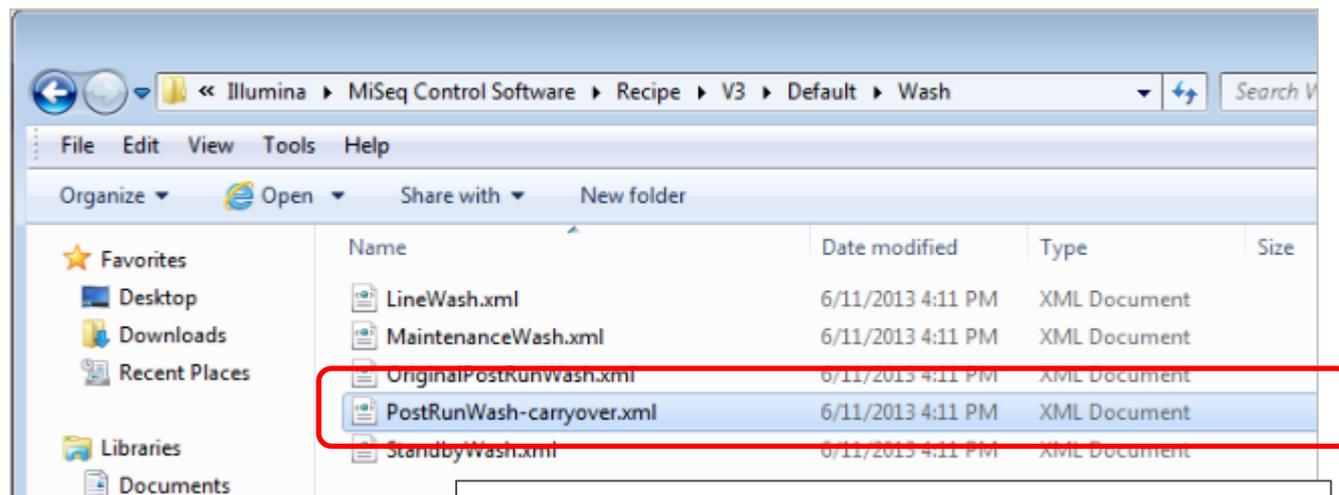
C:¥illumina¥MiSeq Control Software¥Recipe¥[V1~V3]¥Default¥Wash

PostRun Washレシピの置き換え

- ▶ レシピが保存されている場所で、ファイルの置き換えを行う。

C:\illumina\MiSeq Control Software\Recipe[V1~V3]\Default\Wash

Step 1. PostRunWash.xmlのファイル名をPostRunWash-carryover.xmlに変更



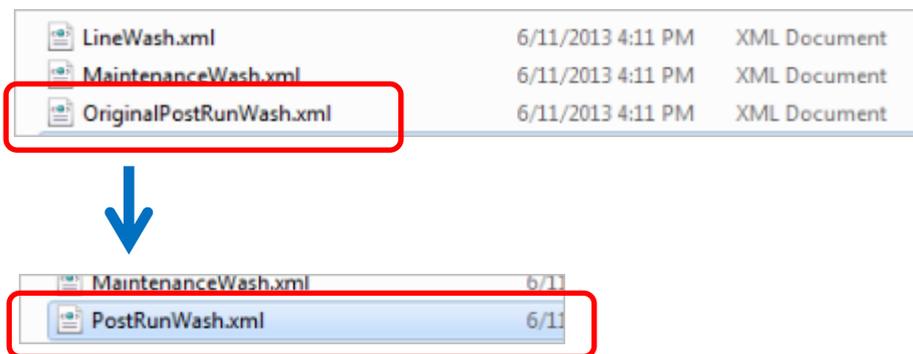
PostRunWash-carryover.xmlに変更する

PostRun Washレシピの置き換え

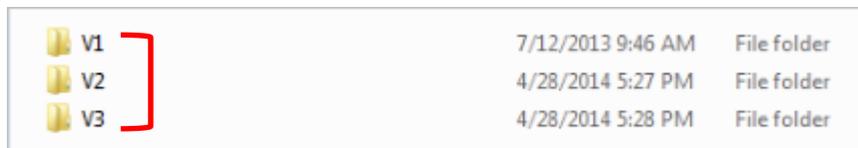
- ▶ レシピが保存されている場所で、ファイルの置き換えを行う。

C:\illumina\MiSeq Control Software\Recipe\[V1~V3]\Default\Wash

Step 2. OriginalPostRunWash.xmlのファイル名を**PostRunWash.xml**に戻す



Step 3. Step1~2を繰り返し、V1~V3のすべてのフォルダも同様に行う。



通常のPostRun Washレシピの置き換えが完了

最後に

- ▶ 洗浄用チューブは、繰り返しご使用いただけます。
- ▶ キャリーオーバー対策用Washをご利用になりたい場合は、テクニカルサポートにお問い合わせください（techsupport@illumina.com）。
プロトコールとWashレシピ、および洗浄用チューブを送付します。