

## PhiX を用いた検証ランの実施方法 (NovaSeq 6000)

本資料では、PhiX controlライブラリーを用いた検証ラン（バリデーションラン）の実施方法をまとめております。

普段該当装置でシーケンスランを行っているお客様で、100% PhiXによる検証ランを行ったことがない方向けの資料となっており、PhiX controlライブラリーのロード前の準備方法と、ランの設定方法についてご案内します。該当装置用のラン試薬（Reagent Cartridge、Flow cellなど）の取り扱いとは通常のランと同じです。該当装置のシステムガイドをご参照ください。

[システムガイド] NovaSeq 6000 Documentation

[https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_instruments/novaseq-6000/documentation.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/novaseq-6000/documentation.html)

<本資料の内容>

### 1. PhiX controlライブラリーの変性方法

- (1) 必要試薬および消耗品 … p. 2
- (2) 試薬消耗品の事前準備 … p. 2
- (3) PhiX controlライブラリーの変性 … p. 3

### 2. シーケンスランの設定方法 … p. 5

\*最新の情報はイllumina社 WEB サイト (<https://jp.illumina.com/>) でご確認ください。



## 1. PhiX controlライブラリーの変性方法

NovaSeq 6000での100% PhiXランに使用するPhiX controlライブラリーの変性方法についてご案内します。

\* PhiX controlライブラリーの推奨ローディング濃度は250 pMです。

\* トラブルシュートのためのバリデーションランの際は、事前にイルミナサポート部に使用するReagent Kitを確認してください。

### (1) 必要試薬および消耗品

準備品	サプライヤー	備考
PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001)	Illumina	FC-110-3002内PhiXでも代用可 SP/S1/S2で2キット、S4で4キット必要
1.0 N NaOH	General supplier	分子生物学用グレード
分子生物学グレードの水	General supplier	MilliQ水など
10 mM Tris-HCl, pH 8.5	General supplier	イルミナ社ライブラリー調製キット内 RSB (Resuspension Buffer) でも代用可
400 mM Tris-HCl, pH 8.0	General supplier	
NovaSeq 6000 Reagent Kit	Illumina	

### (2) 試薬消耗品の事前準備

#### a. NovaSeq 6000試薬カートリッジの準備など

- NovaSeq 6000システムガイドに従って、試薬カートリッジの解凍等の準備を行う。

#### b. NaOHの準備

1. チューブ内で以下の分量で試薬を混ぜ、100 µLの0.2 N NaOH溶液を調製する。
  - 分子生物学グレードの水 (80 µL)
  - 1.0 N NaOH ストック溶液 (20 µL)
2. ボルテックスでよく攪拌する。

\*0.2 N NaOH溶液は、0.2 Nに希釈した状態で作り置きするとpHが変動し、変性効率が低下するため、毎回1.0 Nストック溶液から希釈し直すことをお勧めいたします。(残った0.2 N NaOH溶液は、調製後12時間以内であれば別のライブラリーの変性に使用して問題ありません。12時間以上、次の使用までに時間が空く場合は、残った0.2 N NaOH溶液は廃棄ください。)

#### c. (オプション) PhiX controlライブラリーの定量

- PhiX controlライブラリーの濃度確認のため、二本鎖DNA特異的蛍光法を使用して定量する。

**(3) PhiX controlライブラリーの変性****a. PhiXを1.25 nMに希釈する**

- 以下の分量で溶液を混合し、PhiX controlライブラリーを1.25 nMに希釈する。

モード	10 nM PhiX (μL)	10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (μL)	合計 (μL)
SP/S1	12.5	87.5	100
S2	18.8	131.2	150
S4	38.8	271.2	310

- 1.25 nM PhiX溶液をボルテックスで短時間攪拌する。
- 最大1分間、280 x gで遠心する。

**b. PhiXの変性・中和**

- 1.25 nMに希釈したPhiX溶液に、新しく調製した0.2 N NaOHを以下の分量で添加して変性する。

モード	1.25 nM PhiX溶液 (μL)	0.2 N NaOH (μL)	合計 (μL)
SP/S1	100	25	125
S2	150	37	187
S4	310	77	387

- NaOH添加後のPhiX溶液をボルテックスで短時間攪拌する。
- 最大1分間、280 x gで遠心する。
- チューブを室温で8分間インキュベートし、PhiXライブラリーを一本鎖に変性する。
- 変性後のPhiX溶液に、400 mM Tris-HCl, pH 8.0を以下の分量で添加して中和する。

モード	変性後PhiX溶液 (μL)	400 mM Tris-HCl, pH 8.0 (μL)	合計 (μL)
SP/S1	125	25	150
S2	187	38	225
S4	387	78	465

- Tris-HCl添加後のPhiX溶液をボルテックスで短時間攪拌する。
- 最大1分間、280 x gで遠心する。
- NovaSeq 6000 Reagent Kitに付属しているライブラリーチューブに、変性・中和済みPhiX溶液の全量を移す。
- ただちに、クラスターカートリッジにライブラリーチューブをセットし、ランのセットアップに進む。ライブラリーチューブを含む試薬カートリッジは、30分以内に装置にロードする。

## NovaSeq™ 6000用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法

\*ただちに進められない場合は、ライブラリーチューブに蓋をして、-20℃の冷凍庫で3週間まで保存可能です。解凍後は再凍結しないでください。ライブラリーチューブの保管は、必要な場合にのみ行ってください。長期保管すると重複リードの割合が増える可能性がありますのでご注意ください。

[参考リンク] [NovaSeq 6000 Documentation](#)

[参考リンク] [NovaSeq 6000 System Denature and Dilute Libraries Guide](#)

(1. PhiX control ライブラリーの変性方法、以上)

## 2. シーケンスランの設定方法

PhiX controlライブラリーを用いた、バリデーションランの設定方法についてご案内します。

\*トラブルシュートのためのバリデーションランについては、使用するReagent Kit、ラン設定（サイクル数）をイリミナサポート部に事前に確認してください。

\*Read 1が26サイクル以上、かつサイクル数の合計が、使用するReagent kitの最大サイクル数を超えないラン設定である必要があります。

[参考リンク : Bulletin] [How many cycles of SBS chemistry are in my kit?](#)

### a. NovaSeq Control Software (NVCS) 上でのランの設定

1. NVCSを開く。
2. Home画面で、検証を行う側の「Sequence」を選択。
3. 画面の指示に従い、フローセルをロードする。
4. 画面の指示に従い、cluster/SBS/bufferカートリッジをロードし、廃液ボトルを空にする。
5. 必要であればBaseSpace™ Sequence Hub (BSSH) について設定し、右下「Next」をクリック。

6. Run Setupの画面で、以下のように入力する。

- Run Name : 適当な名前を入力（例：日付-PhiXrunなど）

- Read Length : 事前確認したラン設定を入力

（例）NovaSeq 6000 Reagent kit (300 cycles) を使用し、Read 1を151サイクル、Read 2を151サイクルで行う場合は、下記のようになります。

Read 1=151

Index 1=0（\*重要、100% PhiXランでは、0にする必要があります）

Index 2=0（\*重要、100% PhiXランでは、0にする必要があります）

Read 2=151

- Output folder : 出力フォルダーを変更する場合に使用

- Attachment : BSSHのRun Monitoring and Storageを選択した場合はサンプルシートが必要

- Custom Primers : チェックを入れないでください。（重要）

The screenshot shows the Run Setup interface in NVCS. The 'Run Name' field is filled with 'YYMMDD-PhiXrun'. Below it, the 'Read Length' section has four input fields: 'Read 1' (151), 'Index 1' (0), 'Index 2' (0), and 'Read 2' (151). Underneath, there is a section for 'Advanced Options' with a sub-label 'For this run only'. It contains two rows: 'Output Folder' and 'Attachment', each with a text input field and a 'Browse' button. At the bottom left, there is a checkbox labeled 'Custom Primers' which is currently unchecked.

## NovaSeq™ 6000用：PhiXを用いた検証ランの実施方法

7. 右下にある「Review」を押して、設定を確認する。
8. 設定に問題がなければ、「Start Run」を押してランを開始する。

[参考リンク] [NovaSeq 6000 Documentation](#)

[参考リンク：Bulletin] [How to set up a PhiX validation run on the NovaSeq 6000 sequencing platform](#)

(2. シーケンスランの設定方法、以上)

本資料に関しましてご不明な点等がございましたら、テクニカルサポートまでお気軽にご相談ください。

Tech Support: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

Website: [jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

テクニカルサポート直通 フリーダイヤル: 0800-111-5011 (平日 9:00-17:00)

2023年12月

イルミナ株式会社サービス・サポート部