

PhiX を用いた検証ランの実施方法 (MiSeq)

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] MiSeq Documentation

https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html

<本資料の内容>

1. PhiX controlライブラリーの変性および希釈方法

- (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と希釈方法 … p. 3

2. シーケンスランの設定方法

- (1) **Sample sheet (IEM) を用いた方法**
for MCS (MiSeq Control Software) v2.6以下/Windows 7 … p. 5
- (2) **Local Run Manager (LRM) を用いた方法** for MCS v3.0以上/Windows 7 … p. 7
- (3) **Manual 設定を用いた方法** for MCS v3.0 以上/Windows 7 … p. 10

*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および希釈方法

MiSeqでの100% PhiXランに使用するPhiX controlライブラリーの変性、希釈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の際は、事前にイルミナサポート部に使用するReagent Kitおよび最終ローディング濃度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
1.0 N NaOH	General supplier	分子生物学用グレード
分子生物学用グレードの水	General supplier	MilliQ水など
10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% Tween 20	General supplier	10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (Tweenなし)、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
HT1 (Hybridization Buffer)	Illumina	MiSeq Reagent Kitに同梱
MiSeq Reagent Kit v2あるいはv3	Illumina	

(2) 試薬消耗品の事前準備

a. MiSeq試薬カートリッジの準備など

- ・MiSeq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. HT1の準備

1. HT1を-20℃の冷凍庫から取り出し、室温で解凍する。
2. 完全に溶けたら攪拌し、使用するまで氷上に置いておく。

c. NaOHの準備

1. チューブ内で以下の分量で試薬を混ぜ、1 mLの0.2 N NaOH溶液を調製する。
 - ・分子生物学グレードの水 (800 µL)
 - ・1.0 N NaOH ストック溶液 (200 µL)
2. チューブを数回転倒混和し、中身を混ぜる。

*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。)

d. (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と希釈方法

a. PhiXを4 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4 nMに希釈する。
 - 10 nM PhiX controlライブラリー (2 µL)
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% Tween 20 (3 µL)
- 4 nM PhiX溶液をボルテックスで軽く攪拌した後、スピンドウンする。

b. PhiXの変性

- チューブ中で以下の分量で4 nMに希釈したPhiX溶液と新しく調製した0.2 N NaOHを混合する。
 - 4 nM PhiX溶液 (5 µL)
 - 0.2 N NaOH (5 µL)
- 混合後のPhiX溶液をボルテックスでよく攪拌する。
- 軽く遠心 (280 x gで1分程度) して、チューブの底に溶液を回収する。
- チューブを室温で5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、氷冷したHT1を以下の分量で添加し、20 pMのPhiX溶液1 mLを調製する。
 - 変性したPhiX溶液 (10 µL)
 - 氷冷したHT1 (990 µL)

*変性後20 pM PhiX溶液は、-20°Cの冷凍庫で3週間まで保存可能です。今回使用しなかった溶液は分注して凍結保存できますが、凍結融解を繰り返したり3週間以上保存したりいたしますと、形成されるクラスター数が減少する傾向がありますのでご注意ください。

c. 最終ローディング濃度への希釈

- 変性済20 pM PhiX溶液を氷冷しておいたHT1で希釈し、目的濃度まで希釈した600 µLの溶液を調製する。

	最終ローディング濃度 12.5 pM	最終ローディング濃度 15 pM
変性済 20 pM PhiX 溶液	375 µL	450 µL
氷冷 HT1	225 µL	150 µL
合計	Total 600 µL (12.5 pM)	Total 600 µL (15 pM)

* MiSeq Reagent Kit v2, Nano v2, Micro v2をお使いの場合は、最終ローディング濃度12.5 pMに調製ください。MiSeq Reagent Kit v3をお使いの場合は、事前にイルミナサポート部にローディング

MiSeq™ (Windows 7) 用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法

濃度をご確認ください。

2. 変性済みPhiX溶液を数回転倒混和し、軽く遠心する。
3. 試薬カートリッジにロードするまで氷上に置く。

* 試薬カートリッジを完全に融解したあと、使用する準備ができたなら、調製したライブラリーをカートリッジにロードします。完成した変性PhiXライブラリー溶液600 µLのロード等の方法については、MiSeqシステムガイドをご参照ください。

[参考リンク] [MiSeq Documentation](#)

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

- (1. PhiX control ライブラリーの変性および希釈方法、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。MiSeq Control Software (MCS) のバージョンによって、可能なラン設定方法が異なりますので、最初にMCS トップ画面「？」アイコン>「About」からMCSのバージョンご確認いただき、(1)~(3)、いずれかの方法にてラン設定ください。(MCS v2.6以下の装置は(1) IEM、MCS v3.0以上の装置は(2) LRMあるいは(3) Manual)。

*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?](#)

(1) Sample sheet (IEM) を用いた方法 for MCS (MiSeq Control Software) v2.6以下/Windows 7

a. (オプション) IEM (Illumina Experiment Manager) の準備

1. IEMソフトウェアの最新バージョンをWEBサイトから入手してインストールしておく。

・Illumina Experiment Manager (IEM) Software Downloads (download page)

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager/downloads.html

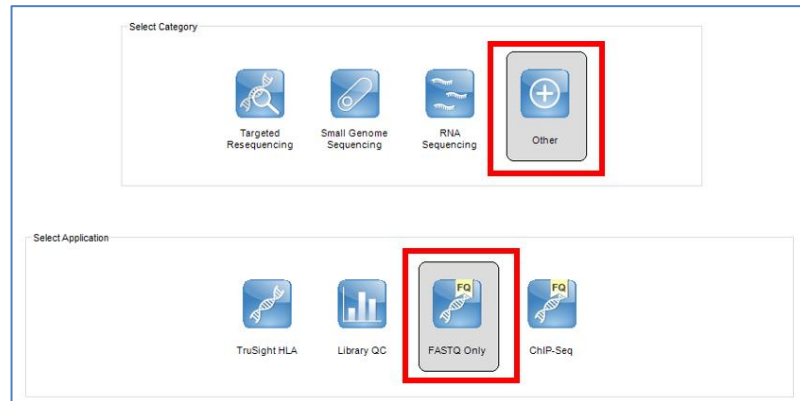
*2023年現在、最新バージョンはv1.19.1になります。他のバージョンをお使いで、下記案内にあるような画面にならない場合は、最新バージョンへのアップデートをご検討ください。

b. IEMでのSample Sheetの作成

*画像はIEM v1.19.1のもので。

1. IEMソフトウェアを起動する。
2. 「Create Sample Sheet」アイコンをクリックする。
3. 「MiSeq」アイコンをクリックし、右下の「Next」をクリックする。
4. 上段のCategoryで「Other」を選択後、下段のApplicationで「FASTQ Only」を選択し、右下の「Next」をクリックする。

MiSeq™ (Windows 7) 用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法



5. Sample Sheet Wizard - Workflow Parametersの画面で下記の内容を指定し、「Next」で次に進む。

* 画面左側、Run settingsには以下のようにご入力ください。

- Reagent Cartridge Barcode: 使用する試薬カートリッジの番号 (例: MS2000006-500)
- Library Prep Workflow : TruSeq Nano DNAを選択
- Index Adapters : TruSeq DNA Single Indexes (A & B) を選択
- **Index Reads : 0 (None) を選択 (*重要)**
- Experiment Name : 適当な名前を入力 (例 : 日付-PhiXrunなど)
- Read Type, Cycle Read 1, Cycle Read 2 : 事前確認したラン設定を入力
(例) MiSeq Reagent kit v3 (600 Cycle) を使用し、Read 1を301サイクル、Read 2を301サイクルで行う場合は、下記ようになります。

Read Type= Paired End

Cycle Read 1=301

Cycle Read 2=301

(他の項目はデフォルトのまま、あるいは空欄で問題ありません。)

* 画面右側のWorkflow-Specific Settingsはデフォルトから変更の必要はありません。

6. Sample Sheet Wizard – Sample Selectionの画面では、行が表示されていない場合「Add Blank Row」を1回クリックし、アスタリスク(*) がついている必須項目を入力する。
 (例) Sample IDにPhiXと入力すると、右下の「Finish」が押せるようになります。

7. 「Finish」をクリックし、保存する。

*以降の、IEMで出力したSample sheetを使ったシーケンスランの開始法は、MiSeqシステムガイド for MiSeq Reporterをご参照ください。

[参考リンク] [MiSeq Documentation](#)

[参考リンク : Bulletin] [How to set up the sample sheet for a PhiX validation run on the MiSeq system using Illumina Experiment Manager](#)

[参考リンク] [Illumina Experiment Manager User Guide](#)

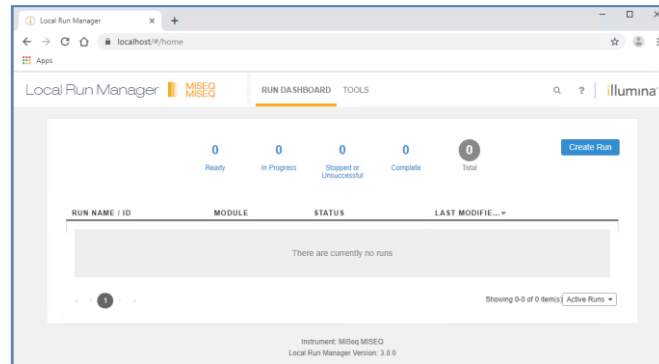
(2) Local Run Manager (LRM) を用いた方法 for MCS v3.0以上/Windows 7

a. LRMの起動

1. MiSeq装置上で、以下のいずれかの方法でLRMのダッシュボードを開く。
 - Desktop上にある、Local Run Manager (LRM) のショートカットをダブルクリック
 - Chromiumなどのブラウザを起動し、アドレスバーに「<https://localhost>」と入力。あるいは、ブックマークに「Local Run Manager (LRM)」があれば、そちらをクリック。

*Local Run Managerでユーザー管理が有効になっている場合、最初にログインページが表示され、ユーザーIDとパスワードの入力が求められます。

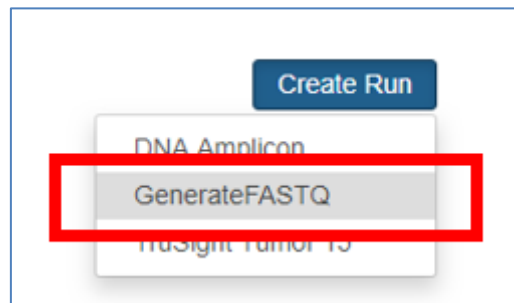
MiSeq™ (Windows 7) 用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法



* 画像はLRM v2.0のもので、装置やバージョンによって細部が異なります。

b. LRM上でのランの作成

1. 「Create Run」を選択し、ドロップダウンリストから「Generate FASTQ」を選択。



2. Create Runの画面で下記の内容を入力する。

* 画面上部、Run settingsまでには以下のようにご入力ください。

- Run Name : 適当な名前を入力 (例 : 日付-PhiXrunなど)
- Library Prep kit : Customを選択
- Index Reads : **0**を選択 (* 重要)
- Read Type, Cycle Read 1, Cycle Read 2 : 事前確認したラン設定を入力
(例) MiSeq Reagent kit v3 (600Cycle) を使用し、Read 1を301サイクル、Read 2を301サイクルで行う場合は、下記ようになります。

Read Type= Paired End

Cycle Read 1=301

Cycle Read 2=301

* 「Custom Primers」には、チェックを入れないてください。 (重要)

MiSeq™ (Windows 7) 用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法

Create Run GENERATEFASTQ

Import Sample Sheet

Run Name *
YYMMDD-PhiXun

Run Description
Run Description

Run Settings

Library Prep Kit * Custom

Index Reads * 0 1 2

Read Type * Single Read Paired End

	READ 1	INDEX 1	INDEX 2	READ 2
Read Lengths *	301			301
Custom Primers	<input type="checkbox"/> Read 1 --			<input type="checkbox"/> Read 2

*他の項目、画面中央の**Module-Specific Settings**に関しては、デフォルト、あるいは空欄のままで問題ありません。

*画面下部、**SAMPLE ID**の表は、一行目に「PhiX」と入力してください。他の項目は空欄のままで問題ありません。

Show Index Sequence

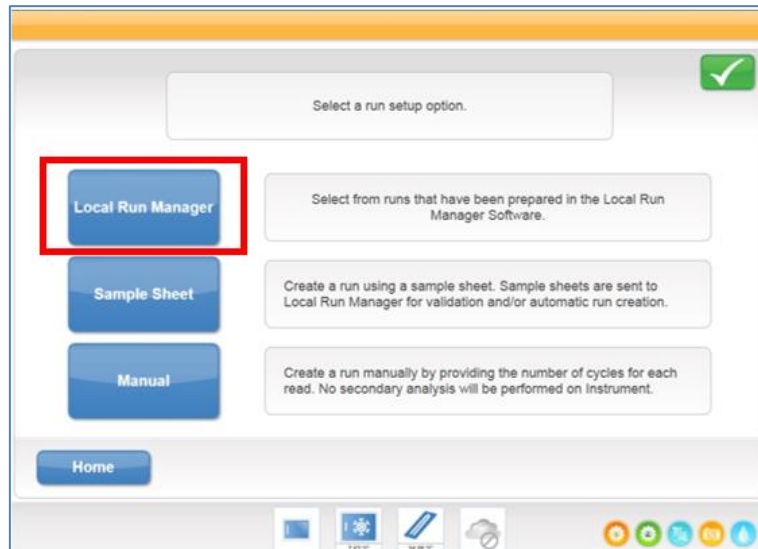
	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	SAMPLE PROJECT
1	PhiX		

+ 1 Rows

Cancel Export Sample Sheet Save Run

- 画面右下の「Save Run」をクリックし、上記ラン設定を保存する。
- LRMのダッシュボードに、2.で作成したRun IDが表示されていることを確認し、ブラウザを閉じる。

*以降、シーケンスランの開始法は、MiSeqシステムガイドをご参照ください。基本的には、MCS (MiSeq Control Software) 画面、「Sequence」から「Local Run Manager」を選択して、必要であればBaseSpace™ Sequence Hub (BSSH) について設定し、「Run selection」の画面で、上記2.の「Run Name」に設定したラン名を選択後、「Next」でセットアップを続ける形になります。



[参考リンク] [MiSeq Documentation](#)

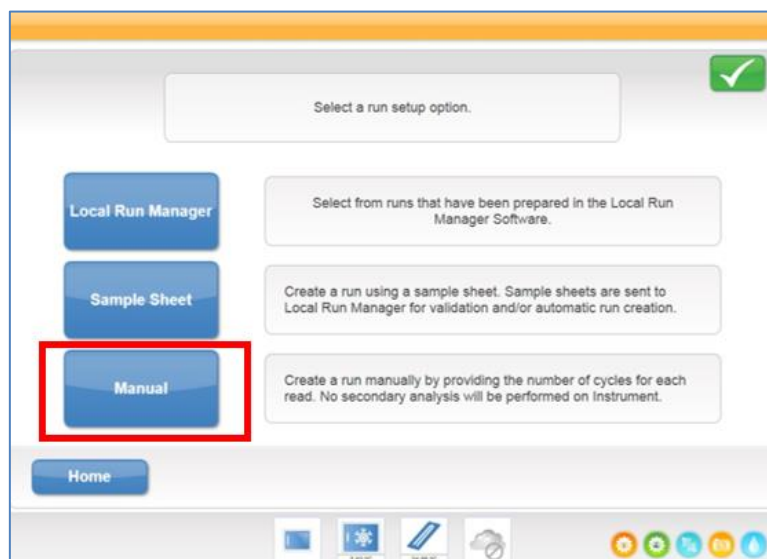
[参考リンク : Bulletin] [Local Run Manager: How to set up a PhiX validation run](#)

(3) Manual設定を用いた方法 for MCS v3.0以上/Windows 7

*この方法では、Fastqファイルは出力されません。出力されるランフォルダサイズを可能な限り小さくしたい場合や、LRMを使用されたくない場合にご選択ください。

a. MCS上でのランの設定

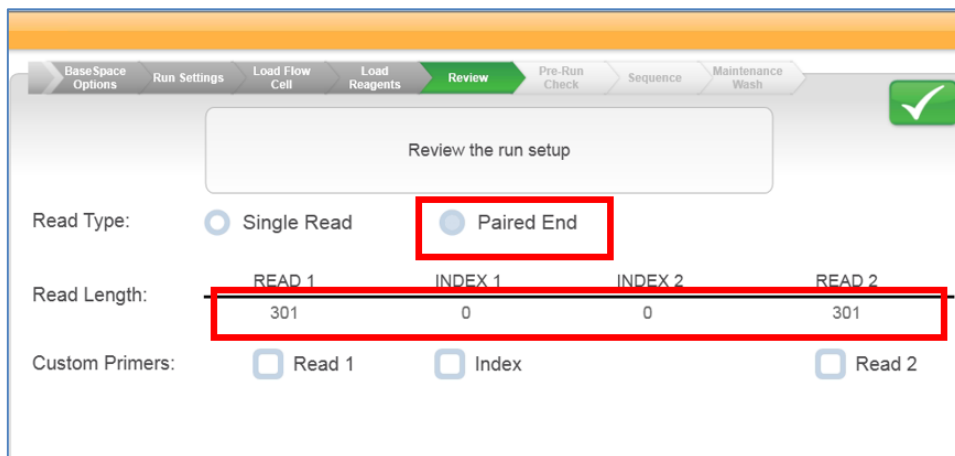
1. 「Sequence」から「Manual」を選択。



2. 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。
3. Run Setupの画面で、以下のように入力する。

MiSeq™ (Windows 7) 用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法

- Read Type, Read Length : 事前確認したラン設定をご入力ください。
 (例) MiSeq Reagent kit v3 (600 Cycles) を使用し、Read 1を301サイクル、Read 2を301サイクルで行う場合は、下記のようになります。
 Read Type= Paired End
 READ 1=301
 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=301
- Custom Primers : チェックを入れないでください。 (重要)



4. 右下にある「Next」を押して、セットアップを進める。

*以降の、Manualモードでのシーケンスランの開始法は、MiSeqシステムガイドをご参照ください。
 [参考リンク] [MiSeq Documentation](#)

(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

Website: 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