

## PhiX を用いた検証ランの実施方法 (NextSeq™ 1000/2000)

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 は通常のランから変更ありません。該当装置のシステムガイドをご参照ください。

[参考リンク] NextSeq 1000/2000 Product Documentation

<https://support.illumina.com/downloads/nextseq-1000-2000-product-documentation-200027171.html>

<本資料の内容>

### 1. PhiX controlライブラリーの希釈方法

- (1) 必要試薬および消耗品 … p. 2
- (2) 試薬の事前準備 … p. 2
- (3) PhiX controlライブラリーの希釈方法 … p. 2

### 2. シーケンスランの設定法

- (1) BaseSpace™ Sequence Hub (BSSH) のみでの設定方法  
for クラウドモードまたはハイブリッドモード … p. 4
- (2) サンプルシート (BSSH上で出力) を介しての設定方法  
for ローカルモード … p. 7
- (3) Manually Set Up New Runを用いた方法  
for スタンドアロンモード … 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ライブラリーの希釈方法

NextSeq 1000/2000でのシーケンスに使用するPhiX controlライブラリーの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
RSB (Resuspension buffer) with Tween 20	Illumina	・ NextSeq 1000/2000 Reagent Kitに同梱 ・ 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% Tween 20でも代用可
NextSeq 1000/2000 Reagent Kit	Illumina	

### (2) 試薬の事前準備

#### a. NextSeq 1000/2000試薬カートリッジの準備など

・もし解凍作業を未実施の場合は、NextSeq 1000/2000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. (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ライブラリーの希釈方法

#### a. PhiXを2 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2 nMに希釈する。
  - ・ 10 nM PhiX controlライブラリー (2 µL)
  - ・ RSB with Tween 20 (8 µL)
- 2 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を650 pMに希釈する

- 以下の分量で溶液を混合し、PhiX溶液を650 pMに希釈する。
  - ・ 2 nM PhiX溶液 (7.8 µL)
  - ・ RSB with Tween 20 (16.2 µL)
- 650 pM 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。

## NextSeq™ 1000/2000用：PhiXを用いた検証ランの実施方法

3. 希釈したPhiX溶液はシーケンス開始まで氷上に静置する。

\*650 pMに調製したPhiX溶液は当日中に使用してください。

**c. 試薬カートリッジへのロード**

1. 650 pMに調製したPhiX溶液20 µLを試薬カートリッジにロードする。

\*試薬カートリッジへのロード等の方法については、NextSeq 1000/2000システムガイドをご参照ください。

[参考リンク] [NextSeq 1000/2000 Product Documentation](#)

- (1. PhiX control ライブラリーの希釈方法、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。

(1)~(3)、いずれかの方法にてラン設定ください。インターネット接続のある装置で、ラン設定をBSSH上で行う場合（クラウドモードあるいはハイブリッドモード）は (1) を、サンプルシートを經由してラン設定を行う場合（ローカルモード）は (2) を、ラン条件をマニュアルで設定する場合（スタンドアロンモード）は (3) を、ご参照ください。

\*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）をイル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 : [Bulletins](#)] [How many cycles of SBS chemistry are in my kit?](#)

### (1) BSSHのみでの設定方法

for クラウドモードまたはハイブリッドモード

\*下記のご案内およびスクリーンショットは、BSSHバージョン7.17.0におけるご案内になります。バージョンによって画面や操作、設定項目が異なる場合があります。

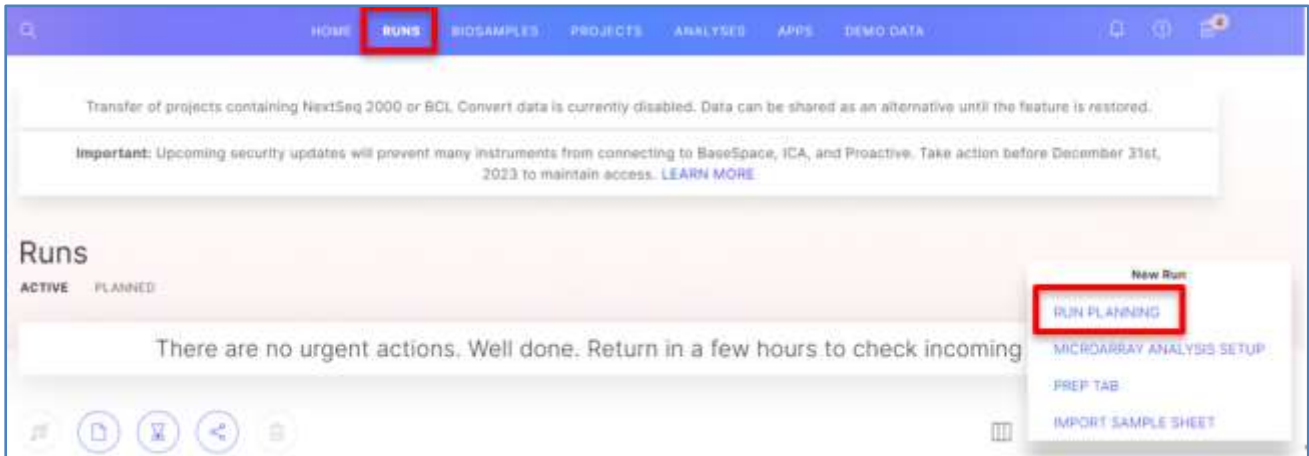
#### a. BSSHでの情報入力

\*BSSHを使用するには事前にアカウント作成が必要です。

1. 装置上、もしくはPCから[BSSH](#)に移動する。
2. BSSHアカウントとして登録したEmail address、Passwordを入力し「Sign In」を選択する。



3. 「RUNS」タブを選択し、右側にある「NEW RUN」アイコンのドロップダウンメニューから「RUN PLANNING」を選択する。



4. Run Settingsの画面で下記の内容を入力する。

- Run Name : 適当な名前を入力 (例 : 日付-PhiXrunなど)
- Instrument Platform : NextSeq 1000/2000
- Secondary Analysis : クラウドモードでは「BaseSpace」、ハイブリッドモードでは「Local」を選択する。

### Run Settings

Run Name \*

Run Name can contain 255 alphanumeric characters, dashes, underscores, periods, and spaces; and must start with an alphanumeric, a dash or an underscore.

Run Description

Run Description can contain 255 characters except square brackets, asterisks, and commas.

Instrument Platform \*      NextSeq 1000/2000

Secondary Analysis \* ?

BaseSpace Storage and compute iCredit charges may apply.

Local

Library Tube ID

255 characters max

5. 右下の「NEXT」をクリックする。

6. Configurationの画面で下記の内容を入力する。

- Application : Illumina DRAGEN™ BCL Convert\*
- Library Prep Kit : Not Specified
- Index Adapter Kit : Not Specified

\*ハイブリッドモードの場合、装置に入っているIllumina DRAGEN BCL Convertのバージョンと同一のものを選択する必要があります。NextSeq 1000/2000 Control Softwareのメニュー画面「DRAGEN」から、Illumina DRAGEN BCL Convertのバージョンをご確認ください。

- Index Reads : No Index
- Read Type : Paired End
- Read Lengths : 事前確認したラン設定を入力  
 (例) NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (300 cycles) v3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
- Sample ID : 一行目に「PhiX」と入力
- FASTQ Compression Format : gzip  
 \* Read 1、Read 2に入れた数字の頭に「Y」がついた数字がOverride Cyclesに自動入力されますので、変更しないでください。  
 \* 他の項目、画面中央のAnalysis Settingに関しては、デフォルト、あるいは空欄のままです。

7. 右下の「NEXT」をクリックする。

## NextSeq™ 1000/2000用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法

8. Run Reviewの内容を確認し「SAVE AS PLANNED」を選択し、ラン条件を保存する。

\*以降、クラウドモードまたはハイブリッドモードでのシーケンスランの開始方法は、NextSeq 1000/2000 Product Documentationをご参照ください。基本的には、NextSeq 1000/2000 Control Software画面「Start」をクリックし、BSSHのログイン情報を入力し「SIGN IN」を選択し、上記4.の「Run Name」に設定したラン名を選択後、「Review」でセットアップを続ける形になります。

[参考リンク] [NextSeq 1000/2000 Product Documentation](#)

## (2) サンプルシート (BSSH上で出力) を介しての設定方法 for ローカルモード

\*下記のご案内およびスクリーンショットは、BSSHバージョン7.17.0におけるご案内になります。バージョンによって画面や操作、設定項目が異なる場合があります。

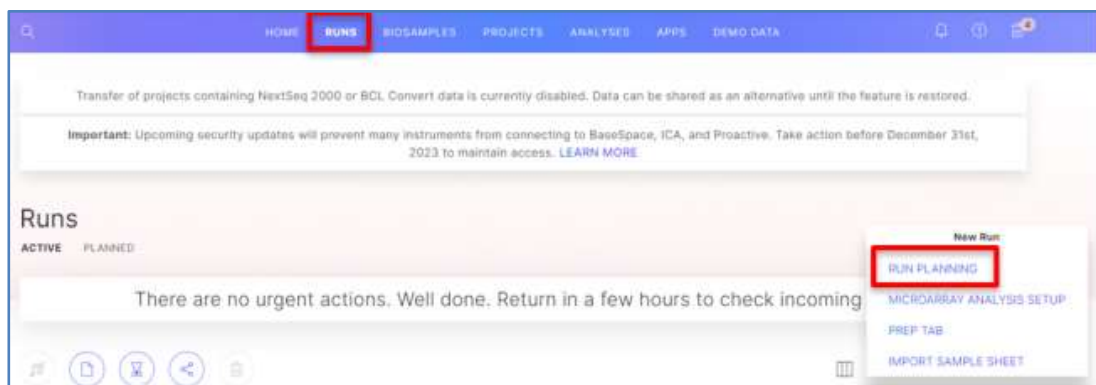
### a. BSSHでの情報入力

\*BSSHを使用するには事前にアカウント作成が必要です。

1. 装置上、もしくはPCから[BSSH](#)に移動する。
2. BSSHアカウントとして登録したEmail addressとPasswordを入力し「Sign In」を選択する。



3. 「RUNS」タブを選択し、右側にある「NEW RUN」アイコンのドロップダウンメニューから「RUN PLANNING」を選択する。



4. Run Settingsの画面で下記の内容を入力する。
  - Run Name : 適当な名前を入力 (例 : 日付-PhiXrunなど)
  - Instrument Platform : NextSeq 1000/2000

- Secondary Analysis : Local

5. 右下の「NEXT」をクリックする。
6. Configurationの画面で下記の内容を入力する。
  - Application : Illumina DRAGEN BCL Convert\*
  - Library Prep Kit : Not Specified
  - Index Adapter Kit : Not Specified

\*装置に入っているIllumina DRAGEN BCL Convertのバージョンと同一のものを選択する必要があります。NextSeq 1000/2000 Control Softwareのメニュー画面「DRAGEN」から、Illumina DRAGEN BCL Convertのバージョンをご確認ください。

- Index Reads : No Index
- Read Type : Paired End
- Read Lengths : 事前確認したラン設定を入力

(例) NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (300 cycles) v3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)



## NextSeq™ 1000/2000用：PhiXを用いた検証ランの実施方法

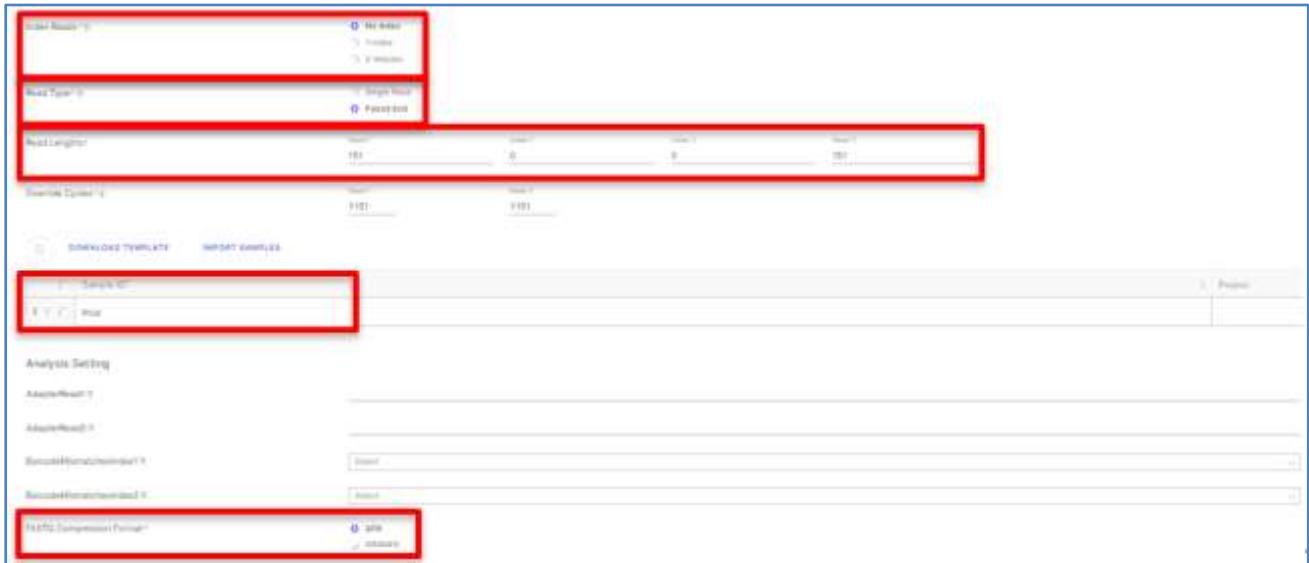
Index 2=0 (**\*重要、100% PhiXランでは、0にする必要があります**)

Read 2=151

- Sample ID：一行目に「PhiX」と入力
- FASTQ Compression Format：gzip

\*Read 1、Read 2に入れた数字の頭に「Y」がついた数字がOverride Cyclesに自動入力されますので、変更しないでください。

\*他の項目、画面中央のAnalysis Settingに関しては、デフォルト、あるいは空欄のままです。



7. 右下の「NEXT」をクリックする。
8. Run Reviewの内容を確認後、「EXPORT」を選択しサンプルシート (SampleSheet.csv) を出力する。

\*以降、サンプルシートを使用した、ローカルモードでのシーケンスランの開始方法は、NextSeq 1000/2000 Product Documentationをご参照ください。

[参考リンク] [NextSeq 1000/2000 Product Documentation](#)

### (3) Manually Set Up New Runを用いた方法 for スタンドアロンモード

\*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、BSSHを使用されたくない場合にご選択ください。

#### a. NextSeq 1000/2000 Control Software上でのランの設定

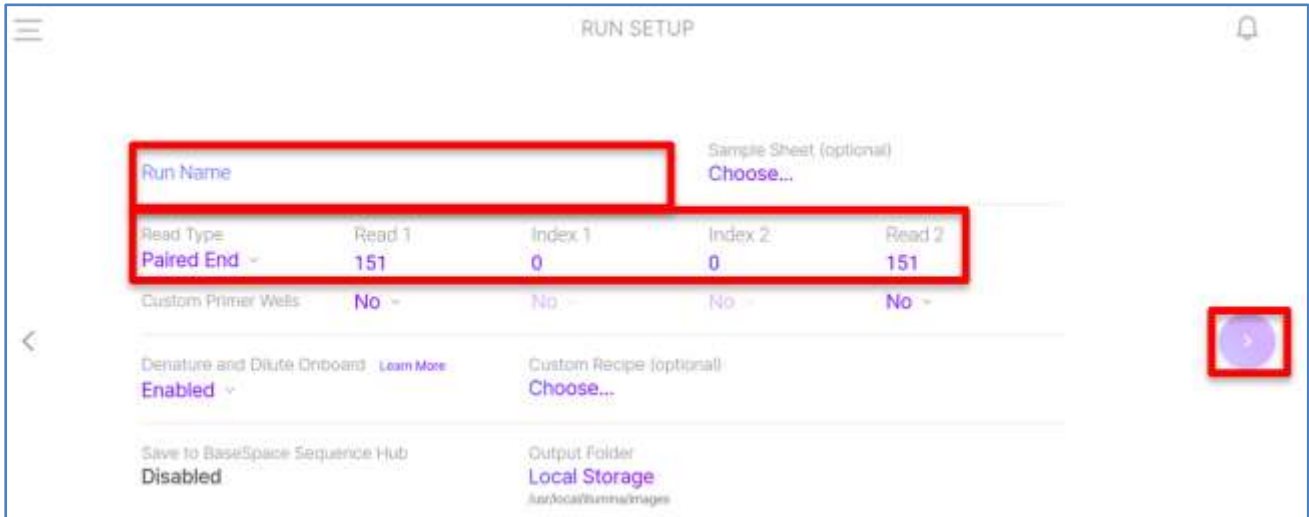
\*下記のご案内およびスクリーンショットは、NextSeq 1000/2000 Control Software v1.5のものになります。Control Softwareのバージョンによって画面や操作、設定項目が異なる場合があります。

1. 「Start」を選択する。
2. 下部にある「Skip BaseSpace Sequence Hub Sign In」を選択する。



3. 「Manually Set Up New Run」を選択し「SETUP」をクリックする。
4. RUN SETUPの画面で下記の内容を入力する。
  - Run Name：適当な名前を入力（例：日付-PhiXrunなど）
  - Read Lengths：事前確認したラン設定を入力
    - （例）NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (300 cycles) v3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
  - \* 「Custom Primer Wells」は、すべてNoにしてください。（\*重要）
  - \* 「Denature and Dilution Onboard」はEnableであることを確認して下さい。
  - \* 「Output Folder」で適切なデータ出力先を設定して下さい。

## NextSeq™ 1000/2000用 : PhiXを用いた検証ランの実施方法



5. 右にある矢印をクリックして、シーケンスランを開始する。

[参考リンク] [NextSeq 1000/2000 Product 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)

2024年2月

イルミナ株式会社サービス・サポート部