

シーケンサー操作ウェビナーシリーズ MiSeq装置に優しいランセットアップとメンテナンス

崎川 真里
イルミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト
September 26, 2018

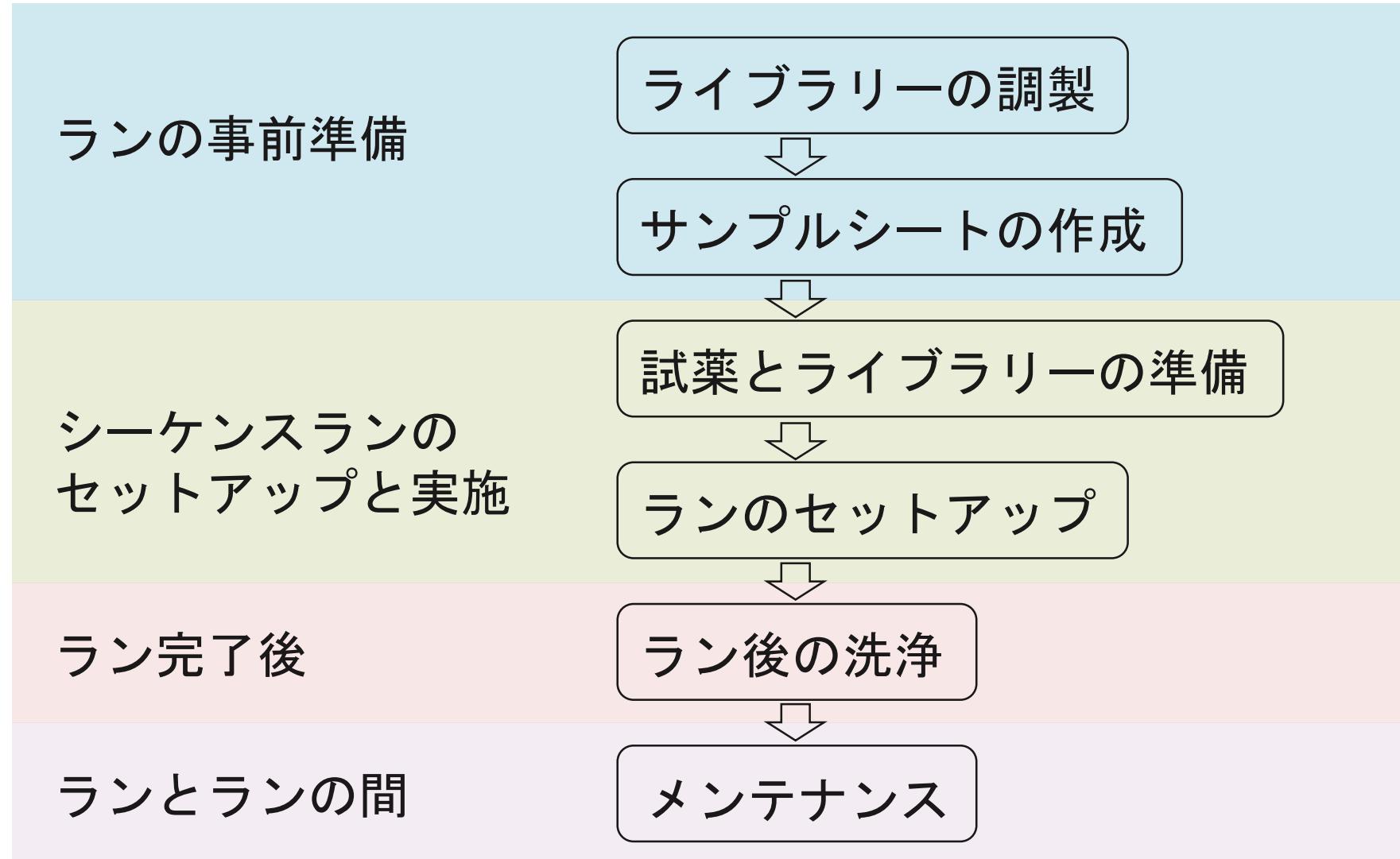


本日の Outline

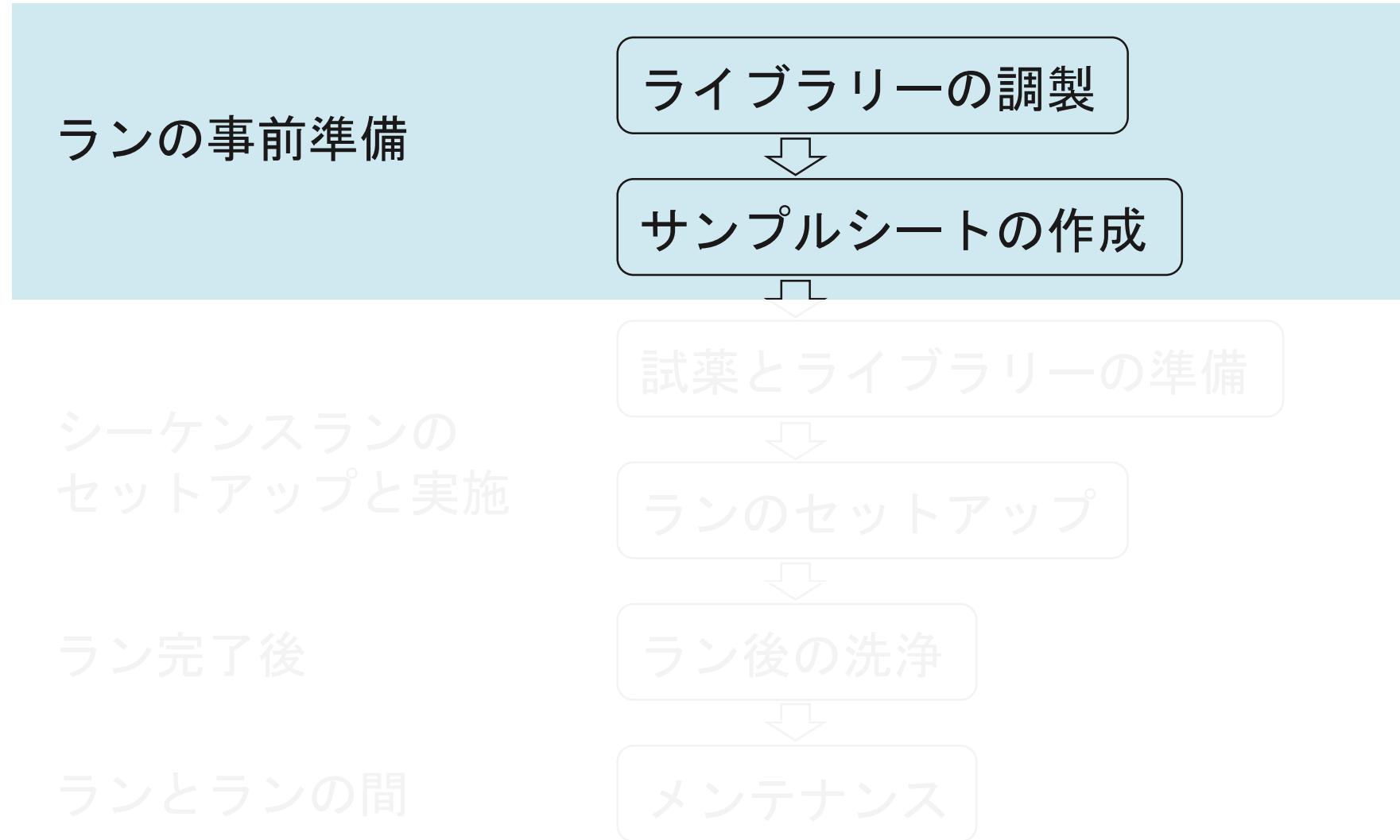
MiSeqでシーケンスを行うためのステップ

- ランの事前準備
- ランのセットアップ
- ラン後の洗浄
- メンテナンス

MiSeq でシークエンスランを行うときのワークフロー

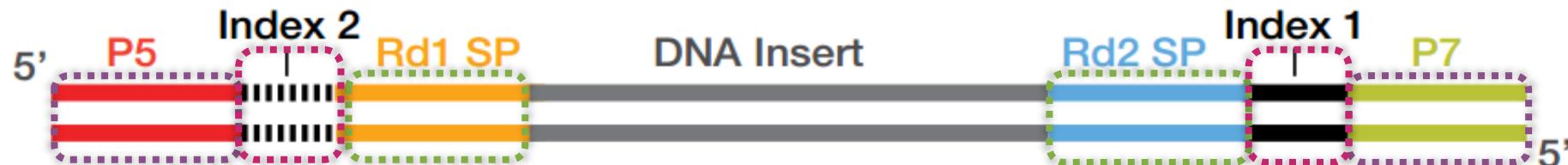


MiSeq でシークエンスランを行うときのワークフロー



ライブラリーの調製

- シーケンスを成功させるための最も重要な工程
- 目的に応じてライブラリー調製キット等を使用し、ライブラリーを準備する



クラスター形成のため:
P5 と P7 配列がライブラリーの両端に必要

シーケンスのため:
シーケンスプライマーの結合配列がDNA Insertの直上・直下に必要

多サンプル処理のため:
インデックス配列が必要

ベストプラクティス

- ライブラリーがMiSeqでのシーケンスランに必要な配列を持つことを確認
- クラスター形成やSBS反応が進まないことによるラン失敗のリスクを減らす
 - アダプター配列がイルミニアダプターと異なる場合は、カスタムのシーケンスプライマーの使用を検討

ライブラリーの調製

- 調製したライブラリーについてクオリティーチェック (QC) を実施する
 - ライブラリーの濃度を確認（定量）
 - QubitやPicogreen（二本鎖DNAを特異的に検出可能）
 - qPCR（アダプター配列を持つライブラリーのみを定量可能）
 - Bioanalyzer（TruSeq Small RNA Library Prep Kitの場合）
- ライブラリーのサイズ分布を確認
 - Bioanalyzer、TapeStationなど
 - トラブルシューティング編：Bioanalyzerを使用したライブラリーQCとトラブルシューティング

https://jp.illumina.com/events/webinar/archive/webinar_160610_j.html

ベストプラクティス

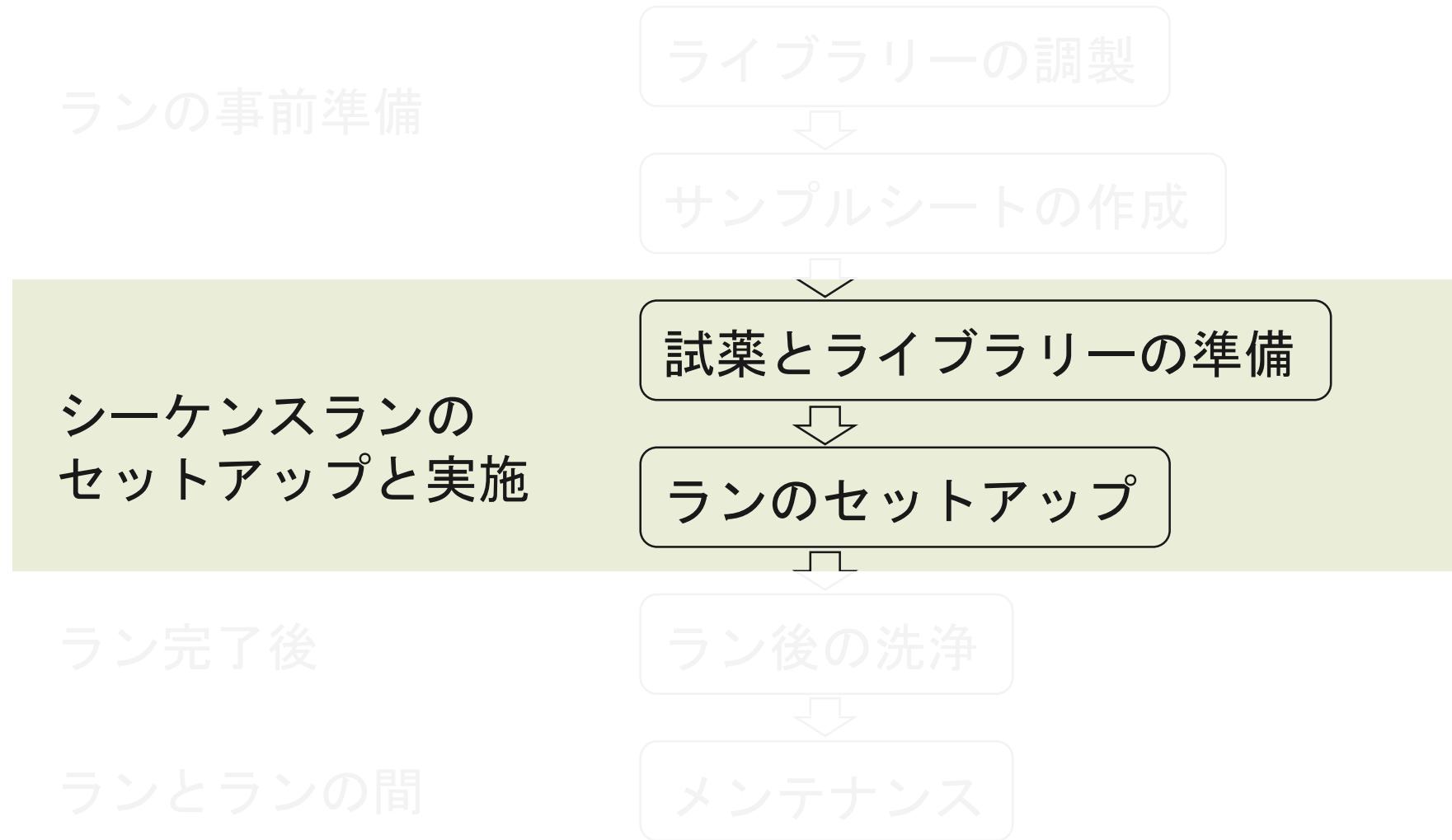
サイズの確認、適切な定量方法でライブラリーの濃度を正確に算出する

- 不正確なインプット濃度はクラスター密度やランの結果（クオリティやデータ量など）に影響する

Sample Sheetの作成

- ラン条件を規定しているファイル
- Illumina Experiment Manager (IEM)を使用して作成
 - サンプルシート作成ツール : Illumina Experimental Manager (IEM) の使用方法 - 最新バージョンIEM v1.15のご紹介
<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180725-j.html>
- MiSeqとは別のPCで作成したSample Sheetをランに使用する場合は、必ずMiSeqのローカルフォルダに保存する
 - Sample Sheetは、MCSの参照フォルダ内に保存する
 - MCSの参照フォルダは、MCSの画面で確認できる
 - RUN OPTIONS > Folder Settings > Sample Sheet Folderの項目に記載
 - 初期設定は D:\Illumina\MiSeq Control Software\SampleSheets フォルダ

MiSeq でシークエンスランを行うときのワークフロー



ランセットアップの流れ

試薬カートリッジを準備



使用するライブラリーをプールし、変性と希釈を実施



希釈・変性したライブラリーを試薬カートリッジにロード



MCSでシーケンスランのセットアップを開始



フローセルを洗浄し、MiSeqに設置



PR2ボトルと試薬カートリッジをMiSeqに設置



ランパラメーターとプレランチェックの結果を確認



ランを開始

ランセットアップの流れ

試薬カートリッジを準備



使用するライブラリーをプールし、変性と希釈を実施



希釈・変性したライブラリーを試薬カートリッジにロード



MCSでシーケンスランのセットアップを開始



フローセルを洗浄し、MiSeqに設置



PR2ボトルと試薬カートリッジをMiSeqに設置



ランパラメーターとプレランチェックの結果を確認



ランを開始

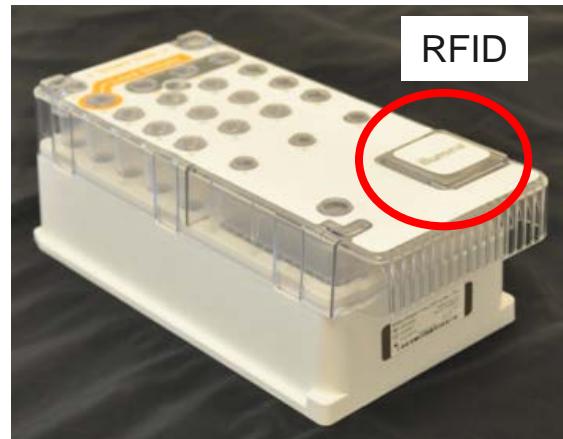
試薬カートリッジについて

- 試薬カートリッジ1つに、シーケンスラン1回に必要な試薬が含まれている
 - 保管温度 : -15~-25°C
 - カスタムのシーケンスプライマー使用時は、規定の濃度に希釀し、カートリッジの適切なポートにロードする

MiSeq System Custom Primers Guide (15041638 01)

<https://support.illumina.com/downloads/miseq-system-custom-primers-guide-15041638.html>

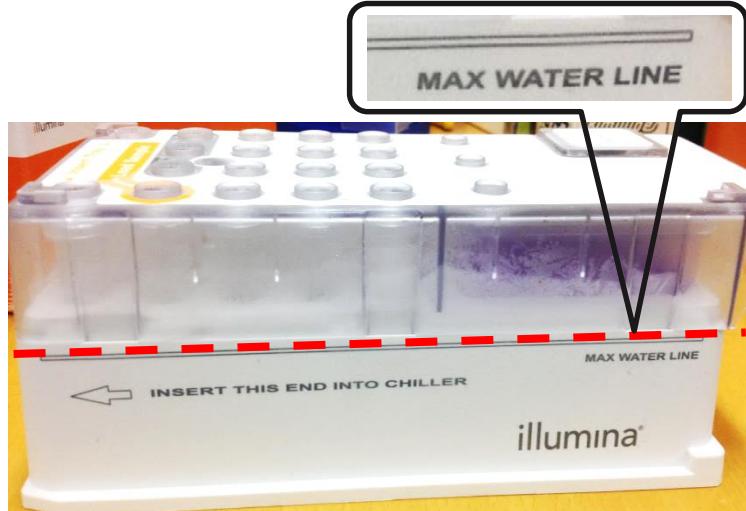
- 試薬情報が書き込まれたRadio-Frequency Identification (RFID) がセットされている
 - ランセットアップ時にMCSがRFIDを読み、試薬情報をランデータに記録する



試薬カートリッジの準備

1. 室温の脱イオン水、MilliQ水等を張った容器に、試薬カートリッジを浸す（約1時間、あるいは試薬が完全に溶けるまで）
 - 水の高さは、カートリッジ側面に記載の"MAX WATER LINE"以下にする
 - 水浴で溶かす代替法として、4°Cで一晩かけて溶かす方法も可能
2. 試薬が完全に溶けたことを確認し、10回転倒混和で混ぜる
3. 実験机にペーパータオルを敷き、カートリッジの底を軽く叩きつけて、試薬をチューブ底に集める
4. 溶解後は氷上または冷蔵で保存する

溶解後の試薬カートリッジは、4°Cで最長1週間安定に保存できる。



ライブラリーのプールと変性・希釈

- 二本鎖DNAのライブラリーを一本鎖 DNAに変性し、シーケンス試薬キット付属の HT1(Hybridization Buffer)で最適濃度に希釈する工程
 - MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (15039740 v06)
https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html
- Nextera XTなどプロトコール中でBeads-Based Normalizationを行ったライブラリーは、この工程でNaOHによる変性を実施しない
 - Normalization後は既に一本鎖への変性が完了しているため
- 準備品
 - ライブラリー
 - 1.0N NaOH
 - HT1

ベストプラクティス

NaOH溶液は毎回1.0Nストック溶液を使用

- 使用期限を過ぎていたり、開封から時間が経過していると、変性効率が低下し、ラン中のクラスター密度が低下する傾向があるので注意

ライブラリーのプールと変性・希釈

- 複数サンプルのライブラリーをランする場合には、予めプリングし、初期濃度（4nMまたは2nM）に調製しておく
- 手順
 - 4nM（または2nM）ライブラリー 5uLと0.2N NaOH溶液 5uLを混合
 - 軽くボルテックスし、遠心してチューブの底に溶液を回収
 - 5分間室温でインキュベート
 - 変性したライブラリー溶液 10uLに氷冷したHT1を990uL 加える
→ 20pM（または10pM）の変性済みライブラリーとなる
 - 変性済みライブラリーをHT1で希釈し、適切な最終濃度(pM)に調整
 - 使用直前まで氷上に静置
- 最終濃度のライブラリー 600uLを、試薬カートリッジの17番ポートにロードする

ベストプラクティス

最終濃度に調製したライブラリー溶液中のNaOHが1mM以下であること

- 高濃度のNaOHが残存していると、フローセル表面のオリゴへのライブラリーのハイブリが阻害され、クラスター密度低下やクラスター形成不良の原因に

ライブラリーの変性・希釈

- ベストプラクティス

- 0.2N NaOH溶液
 - 1.0N NaOH（または固体のNaOH）から使用直前に用意調製
0.2N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
 - pH試験紙で、0.2N NaOHがpH 13以上であることを確認
pH13を下回ると変性効率が低下し、クラスター密度が低下
 - 次の使用までに12時間以上あく場合は、残った0.2N NaOHは廃棄
- ライブラリー
 - 最終濃度は、シーケンス試薬とライブラリータイプを考慮して決定
 - MiSeq v2試薬利用の場合は12.5pM、MiSeq v3試薬の場合：15pMを目安
 - ライブラリーサイズが300bp以下の場合：v2・v3試薬ともに10pMを目安
 - ライブラリーサイズが500bp前後であっても、Low diversityサンプルの場合は6~8pMを目安（クラスター密度700-800K/mm²が理想）
 - ラン結果を参考にし、以降のランで最終濃度を調整

ランセットアップの流れ

試薬カートリッジを準備



使用するライブラリーをプールし、変性と希釈を実施



希釈・変性したライブラリーを試薬カートリッジにロード



MCSでシーケンスランのセットアップを開始



フローセルを洗浄し、MiSeqに設置



PR2ボトルと試薬カートリッジをMiSeqに設置



ランパラメーターとプレランチェックの結果を確認



ランを開始

ランセットアップの流れについて、
ウェビナー当日は動画を再生いたしました。
録画よりご覧ください。

シーケンスランのセットアップ

- ベストプラクティス

- フローセルの洗浄
 - フローセルをMilliQ水で洗浄、レンズ紙で水滴をしっかり拭き取る
 - ・灰色プラスチック部分の隙間もしっかり洗浄し、水気をきる
 - フローセル容器はバッファーを残したままラン完了まで保管する

- フローセルステージのチェック
 - フローセル設置前にクリーニングを行う

析出物によりフローセルの高さが変わる。ラン中に
規定の高さでフォーカスが取れず、フォーカスエラー
の原因となる。
 - 付着物がない場合

キムワイプをMilliQ水等で濡らし、拭き取る
 - 付着物や析出物がある場合

プラスチック定規（またはヘラ等）の平らな面で優しく削り、MilliQ水等で濡らしたキムワイプで拭く



フローセルステージ

(付着物がない状態)

シーケンスランのセットアップ

- ベストプラクティス

- 試薬カートリッジのロード
 - 試薬庫内にしっかり奥まで挿入する
- フローセルや試薬のセット時に、RFIDが読み取れないエラーが出た場合
 - RFIDバイパスコードを取得する
MiSeqのランのセットアップ時・開始時によくあるトラブルの対処方法
https://jp.illumina.com/events/webinar/2017/webinar_170726_j.html
- 廃液ボトルは毎ラン前に空にする
- ラン開始後は振動を最小限にし、画面やドアの操作を行わない

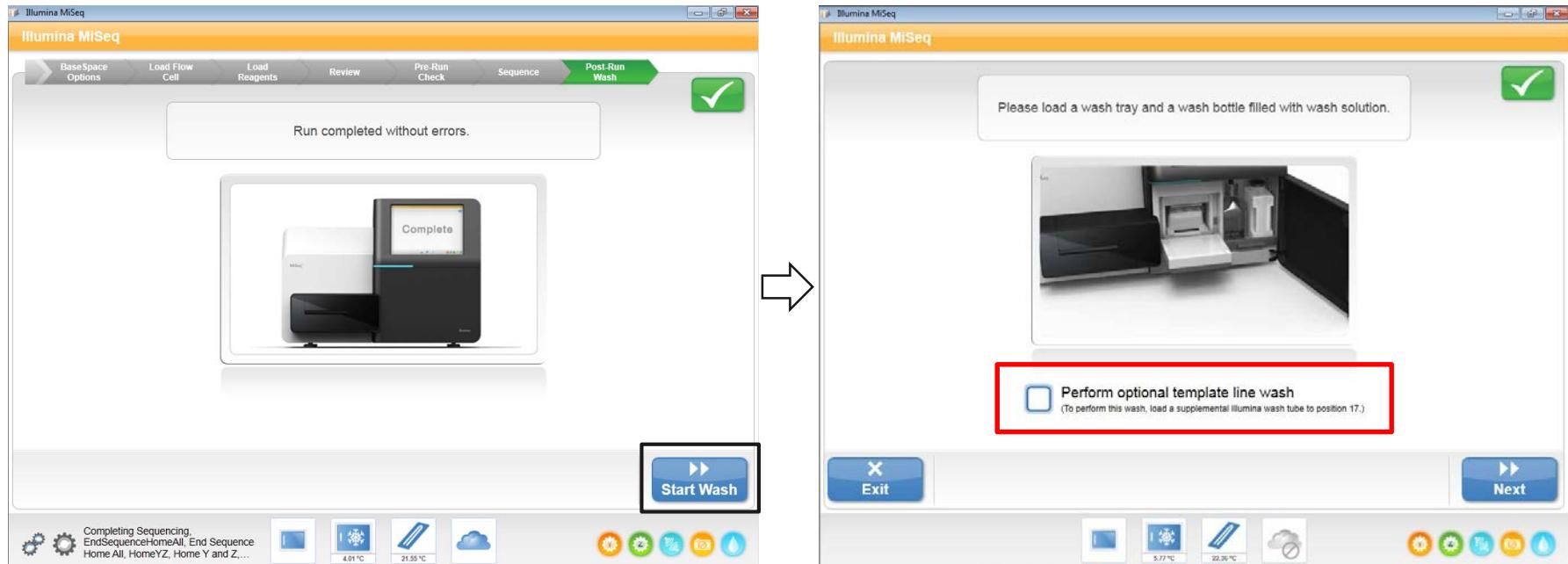
MiSeq でシークエンスランを行うときのワークフロー



ラン後の洗浄

- ポストランウォッシュ

- ラン完了後の画面に沿って、ポストランウォッシュ画面に進む
- 洗浄はラン後、間を空けずに実施することが望ましい
- Optionで「Template line wash」も選択可能（MCS v2.5以降）



Option : Template line washについて

- 次亜塩素酸溶液を使用し、カートリッジの17番ポート（ライブラリーをロードする箇所）を重点的に洗浄するプロトコール
 - 高感度のアプリケーションを利用するお客様を対象
- ラン間の洗浄方法の違いによる、前ランからのサンプルキャリーオーバーの割合
 - Maintenance Washを行った場合 : 0.1%
 - Template line washを行った場合 : 0.001%
- Optionの選択可否
 - MCS v2.5以降のバージョンは、デフォルトでOptionを選択可能
 - MCS v2.4以前のバージョンを使用中の場合は、ウォッシュレシピの変更が必要
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

https://jp.illumina.com/events/webinar/archive/webinar_140822_j.html

ポストランウォッシュの準備

- Template line washを行わない場合

- 準備品

- Tween20
 - ラボラトリーグレード水
 - 使用済みフローセル、ウォッシュトレイとウォッシュボトル

- 溶液の準備とセット

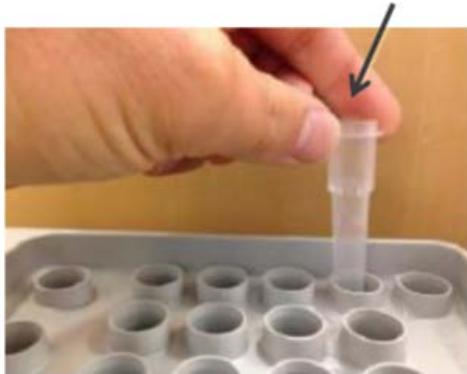
- 100% Tween20とラボラトリーグレード水を混合し、洗浄溶液（0.5% Tween20）を調製
 - 0.5% Tween20溶液をウォッシュトレイとウォッシュボトルに分注
 - ・ ウォッシュトレイ：1ポートあたり6mLを目安に入れる
 - ・ ウォッシュボトル：350mL入れる

ポストランウォッシュの準備

- Template line washを行う場合

- 準備品

- Tween20
- ラボラトリーグレード水
- 6%程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液(Sodium Hypochlorite)
- 使用済みフローセル、ウォッシュトレイとウォッシュボトル
- Template line wash用のチューブ ***必ず専用チューブを使用する**



Template line washを初めて利用する場合は、
テクニカルサポートへお問い合わせください。
専用チューブをお送りします。
洗って繰り返し使用可能です。

ポストランウォッシュの準備

- Template line washを行う場合

- 溶液のセット

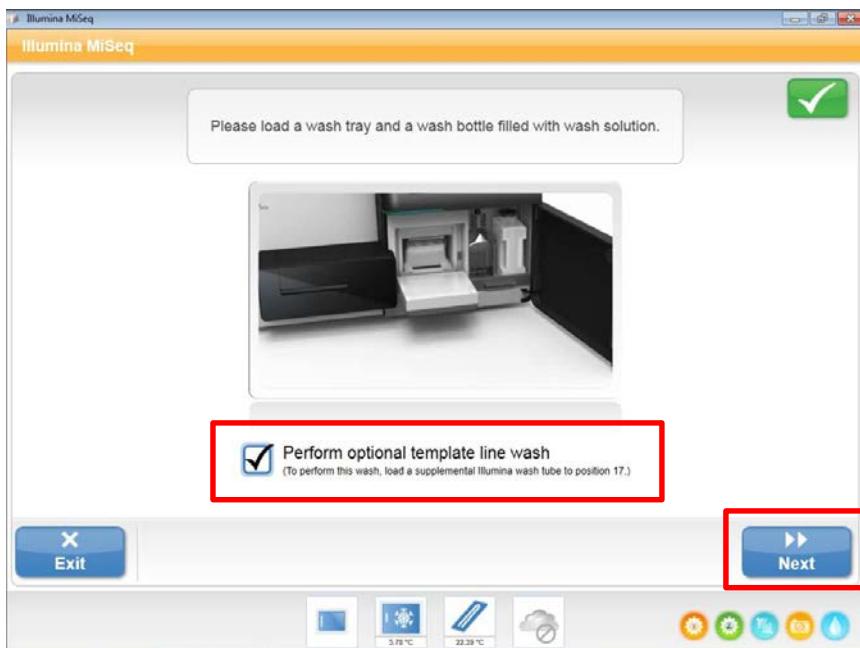
- 0.5% Tween20溶液をウォッシュトレイとウォッシュボトルに分注
 - ・ウォッシュトレイ：17番ポート以外のポートに6mLを目安に入れる
 - ・ウォッシュボトル：350mL入れる
- 次亜塩素酸ナトリウム溶液をPW1、MilliQ水等で希釀し、1mLの0.01% 次亜塩素酸ナトリウムを調製
 - ・0.01% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 1mLをTemplate line wash用の専用チューブに分注する
 - ・分注後のチューブを、試薬カートリッジ17番ポートに差し込む

ウォッシュトレイの準備について、
ウェビナー当日は動画を再生いたしました。
録画よりご覧ください。

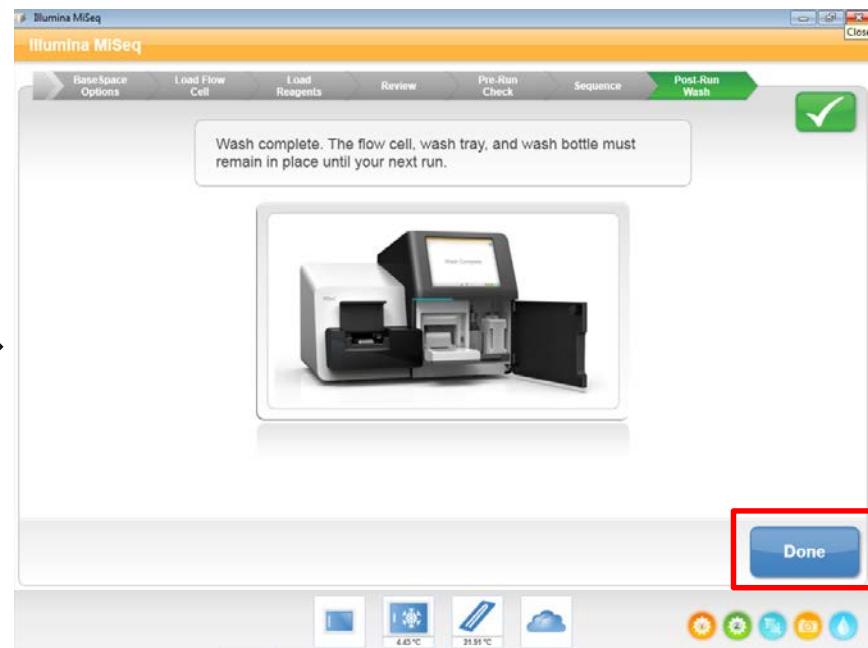
ポストランウォッシュ

- Template line washを行う場合は[Perform optional template line wash]にチェックを入れる
- 洗浄溶液等すべての備品をセットし、[Next]で洗浄開始
- 洗浄完了画面で、[Done]をクリックしてHome画面に戻る

洗浄開始前



洗浄完了後



MiSeq でシークエンスランを行うときのワークフロー

ランの事前準備

シークエンスランの
セットアップと実施

ラン完了後

ランとランの間

ライブラリーの調製

サンプルシートの作成

試薬とライブラリーの準備

ランのセットアップ

ラン後の洗浄

メンテナンス

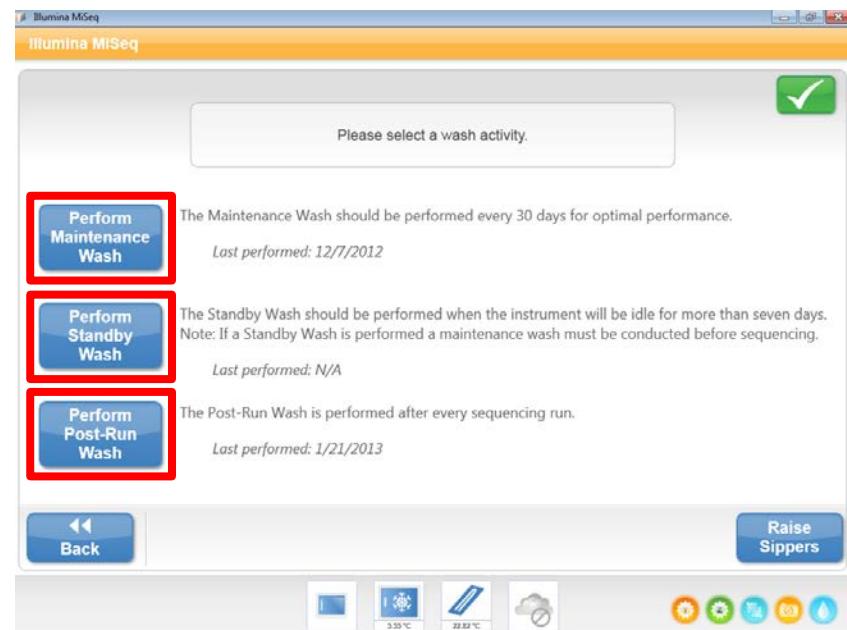
メンテナンスについて

- 洗浄の実施
 - 流路を清潔に保つ
- 試薬庫の温度確認
 - ラン中の試薬カートリッジを冷やすため、庫内が冷却されている
 - 庫内の温度が上がっても、MCS上にエラーは出ない
- Dドライブのファイルの整理
 - 空き容量が少ない場合はプレランチェックでエラーとなり、ランを開始できないことがある
- 装置の電源オフ・オン

洗浄の実施

- 3つのウォッシュ

- Home画面から、[PERFORM WASH]をクリック
- 3つのウォッシュを選択できる
 - メンテナンスウォッシュ
 - スタンバイウォッシュ
 - ポストランウォッシュ



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina®

オプション1：メンテナンスウォッシュ

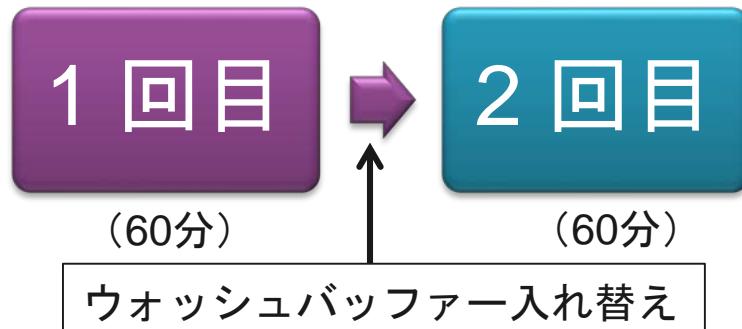
- 装置維持のため、30日に一度の頻度で実施
- 所要時間：20分 x3 セット（約60分）
- 1セットの洗浄毎に洗浄溶液を入れ替えることが望ましい
- 期待廃液量：3x17.25mL（約52mL）

【訂正】ウェビナー動画内ではTemplate line washをオプションで選択可能とお伝えしていますが、誤りです。お詫びして訂正いたします。



オプション2: スタンバイウォッシュ

- 7日以上装置を稼動させないことがわかっている場合に行う
- 実施後に装置はStandby Modeに切り替わり、解除のためにはメンテナンスウォッシュの実施が必要
- 所要時間：60分 ×2 セット（約120分）
- 1セットの洗浄毎に洗浄溶液を入れ替えることが望ましい
- 期待廃液量：2×45mL（約90mL）



オプション3: ポストランウォッシュ

- ラン完了後に実施する洗浄と同じ内容
 - OptionでTemplate line washが選択可能 (MCS v2.5以降)
- ラン開始前の簡易ウォッシュにも利用可能
- 所要時間 : 20~30分 x1 セット
- 期待廃液量 : 17.25mL
 - Template line wash実施時は、25.5mL

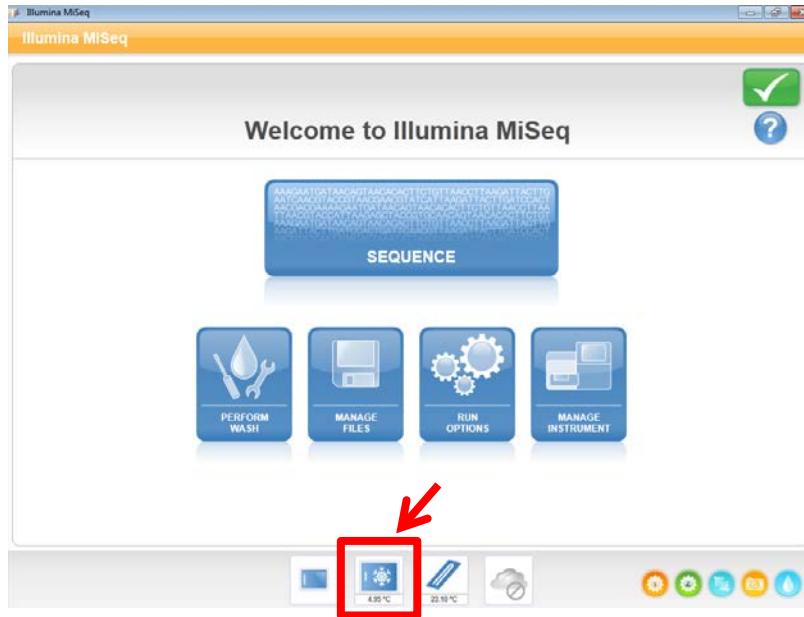
洗浄の実施

- ベストプラクティス

- 洗浄に使用したフローセル、ウォッシュトレイとウォッシュボトルは次回のランまでそのまま残しておく
 - フローセルステージ上やシッパーからの落滴、流路内への気泡の発生を抑える
- 装置を長期間使用しない場合は、MilliQ 水等のラボラトリーグレード水でメンテナンスウォッシュを実施する
 - 流路でのカビやバクテリアの繁殖、詰まりを防ぐ
 - 次の使用前に 0.5% Tween20でメンテナンスウォッシュを行う
- 試薬庫の底に結露水がたまっている場合は、キムタオル等で拭き取る

試薬庫の温度確認

- MCSのHome画面で試薬庫の温度を確認する
 - 目安：11°C以下



- 試薬庫の温度が下がらない場合
 - 装置をおいている部屋の室温を確認（室温は $22+/-3^{\circ}\text{C}$ を推奨）
 - 装置の再起動を行い、数時間おいて様子を見る

Dドライブのファイルの整理

- MiSeqのラン開始前は、Dドライブの空き容量が少なくとも100GB以上あることを推奨
- 定期的に過去のランデータのバックアップを取り、MiSeqのPCからはデータを削除することをお勧めする
- デフォルトでは、3つのフォルダ内にランデータが保存される
 - D:\Illumina\MiSeqTemp フォルダ
 - MiSeqTemp フォルダのみラン後7日たつとデータが自動的に削除される
 - D:\Illumina\MiSeqOutput フォルダ
 - D:\Illumina\MiSeqAnalysis フォルダ
 - MiSeqOutput と MiSeqAnalysis フォルダ内のランデータは手動で削除する
- フォルダ内のファイル構成について
 - MiSeq Output and Analysis Folders (15034791 C)

http://support.illumina.com/downloads/miseq_run_folder_quick_reference_card_15034791.html

Dドライブのファイルの整理

- MiSeqOutputとMiSeqAnalysis フォルダ

- 画像ファイルを含む以下のフォルダのみ、MiSeqOutput フォルダに保存されている
 - Images フォルダ
 - Thumbnail_Images フォルダ（全サイクルのサムネイル画像）
 - MiSeqAnalysis フォルダ内のランフォルダには、1サイクル目のみ保存される
- Thumbnail Imagesはクラスターの画像ファイル(.jpg)で、ランのトラブルシュートで使用することがある
 - ラン結果に問題がない場合は、保存しておく必要はない

ベストプラクティス

過去のランデータのバックアップをとる場合は、MiSeqAnalysis フォルダ内のラン フォルダ全体をコピーする

- トラブルシュートが必要な場合、MiSeqOutput フォルダ内のランデータも残す
- 既にバックアップをとった過去のランデータはDドライブから適宜削除する

装置の電源オフ・オン

ウォッシュトレイの準備について、
ウェビナー当日は動画を再生いたしました。
録画よりご覧ください。

- 装置の電源をオフにする場合

- MCSのMANAGE INSTRUMENT > Shut Downをクリック
- 装置背面の電源ボタンを**オフ**にする

- 装置の電源をオンにする場合

- 装置の電源をオフしてから、次に起動するまで1分以上間隔をあける
- 装置背面の電源ボタンを**オン**にする (MCSまで自動的に起動する)

ベストプラクティス

常に 装置の電源オンにおいて良いが、使用毎（ラン前）に装置の再起動（装置の電源オフ・オン）を行うことを推奨

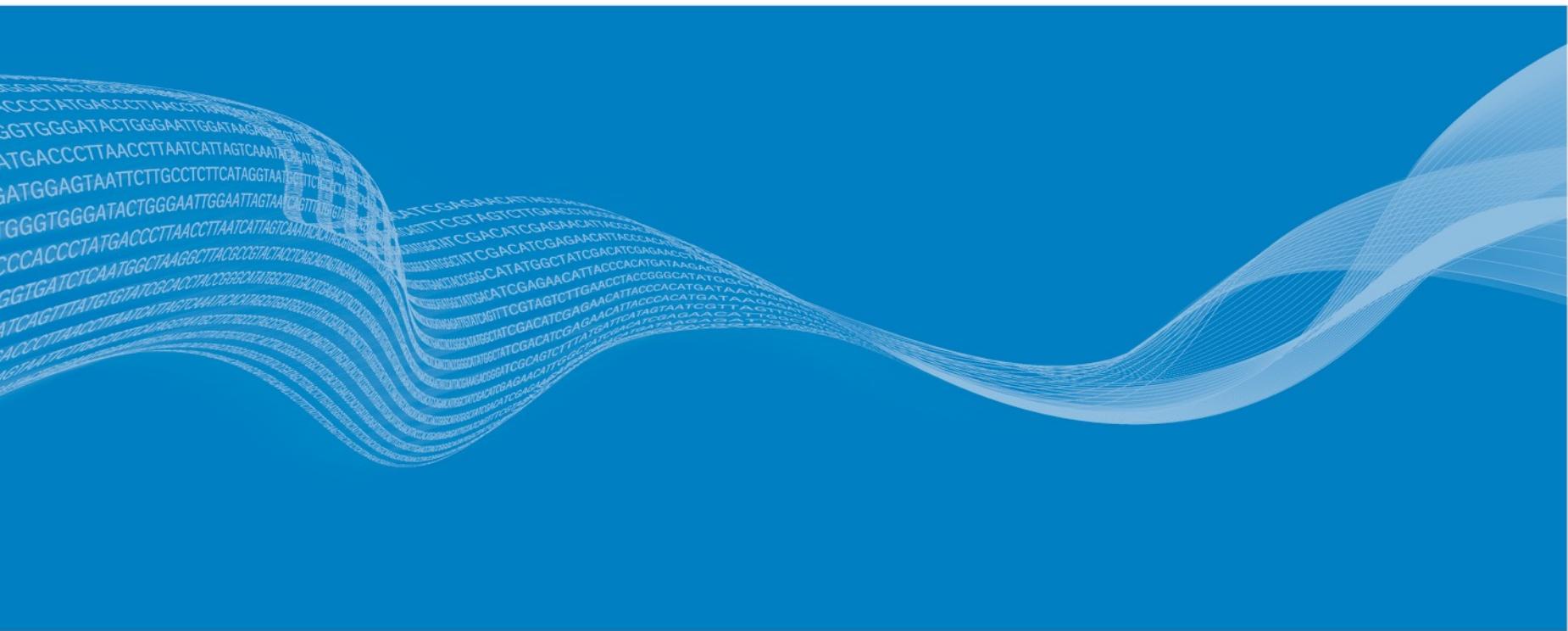
- PCのメモリーをフレッシュにする

10日以上アイドル状態にすることが分かっている場合には電源を落とす

- 試薬庫を冷やすために、次の使用前日には電源を**オン**することを推奨

装置の起動時には、外付けHDD等のUSBをはずす

サポート資料



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina®

テクニカルTips・オンライントレーニング

- テクニカルTips
 - MiSeq・NextSeq・MiniSeq システムでの PhiX バリデーションランの手順
<https://jp.illumina.com/landing/technicals/ts-tips-phix-validation-run.html>
 - MiSeq でフォーカスエラーが発生した際の対処法について
<https://jp.illumina.com/landing/technicals/ts-tips-miseq-focus-error.html>
 - オンライントレーニング
http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/training.html
 - MiSeq: Introduction to the MiSeq System
 - MiSeq: Getting Started
 - MiSeq: How to Start a Run
 - MiSeq: Instrument Washes
- 各トレーニングコースのDescriptionにJapaneseと記載がある場合は、日本語字幕で視聴可能（動画が再生されない場合はブラウザを変えてお試しください）

ご清聴ありがとうございました