

PhiX を用いた検証ランの実施方法

本資料では、PhiX を用いた装置や試薬の検証ランの実施方法をまとめている。

1. PhiX コントロール DNA の変性と希釈方法
2. シーケンスランの設定
 - Local Run Manager (LRM) を利用の場合
 - BaseSpace Sequence Hub を利用の場合

1. PhiX コントロール DNA の変性と希釈方法

MiniSeq でのシーケンスに使用する PhiX コントロール DNA の変性、希釈方法について記載している。最終的に 1.5pM の変性済み PhiX 溶液を調製する。

a. 必要試薬および消耗品

以下の品がライブラリーの変性と希釈に必要となる。

| Consumable | Supplier |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| PhiX 10 nM | Illumina, catalog# FC-110-3002 |
| RSB (Resuspension Buffer) | |
| HT1 (Hybridization Buffer) | Illumina, Component of MiniSeq Kit |
| 1.0 N NaOH, molecular biology-grade | General lab supplier |
| 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 | General lab supplier |

b. ベストプラクティス

・ライブラリーの変性に使用する NaOH 溶液は、毎回 1.0N ストック溶液から希釈し直したものを使用すること。

※0.1N 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。

・ピペット誤差が NaOH の最終濃度に与える影響を抑えるため、取り扱い体積の小さいピペットでの 0.1N NaOH の調製は避ける。P1000 ピペットを使用し、余分量(1 ml)を毎回作成する。

1. 使用する試薬の準備

以下の試薬を用いて MiniSeq 向けのライブラリーを変性、および希釈する。

0.1 N NaOH : 必ず用事調製し、作製後 12 時間以内に使用すること。

HT1 : HT1 (Hybridization Buffer) は、変性済み PhiX の希釈に使用する。

RSB buffer (or Qiagen EB Buffer) : RSB or EB Buffer は、変性前の PhiX の希釈に使用する。

a. NaOH の希釈

1. エッペンチューブ内で以下の分量で試薬を混ぜ、1 ml の 0.1 N NaOH 溶液を調製する。
 - ・分子生物学グレードの水 (MilliQ 水) (900 μ l)
 - ・1.0 N NaOH ストック溶液 (100 μ l)

- チューブを何回か転倒攪拌し、中身を混ぜる。

NOTE

サンプル DNA や PhiX コントロールの変性には、毎回新しく調製し直した 0.1 N NaOH 溶液を使用すること。

残った 0.1 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ない。

12 時間以上、次の使用までに時間が空く場合は、残った 0.1 N NaOH 溶液は廃棄する。

b. HT1 の溶解

- HT1 (Hybridization Buffer) を -20°C の冷凍庫から取り出し、室温で溶解させる。
- 完全に溶けたら、NaOH で変性したサンプルの希釈に使用するまで 4°C に置いておく。

c. RSB の溶解

- RSB を -20°C の冷凍庫から取り出し、室温で溶解させる。
- 完全に溶けたら、サンプルの希釈に使用するまで 4°C に置いておく。

2. PhiX の変性と希釈

PhiX コントロール DNA の変性。濃度調整は以下の手順に沿って行う。

NOTE

PhiX を 2 週間以上保存する場合には、4 or 10 nM の濃度で -20°C に保管することを勧める。20 pM まで希釈した状態で 2 週間以上保管すると、保管前と比べてクラスター形成数が低下する。

a. PhiX を 4 nM に希釈する

- 10 nM PhiX (チューブに入った原液) を室温で溶解させる。
- 1.5 ml 遠心チューブの中で以下の分量で溶液を混合し、PhiX を 4 nM に希釈する。
 - ・ 10 nM PhiX library (2 μl)
 - ・ RSB (3 μl)この操作により、4 nM の PhiX 溶液 5 μl が得られる。
- 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。

NOTE

4 nM に希釈した PhiX 溶液は、 -20°C で 3 カ月まで安定に保管できる。

b. PhiX の変性・中和

1. 1.5 ml 遠心チューブの中で、以下のように試薬類を混合する。
 - ・ 4 nM PhiX 溶液 (5 μ l)
 - ・ 新しく調製した 0.1N NaOH (5 μ l)
2. 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。
3. 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 DNA に変性する。
4. 5 μ l の 200 mM Tris-HCl (pH=7.0) を PhiX 溶液に加える。
5. 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。

c. Loading 濃度 1.5 pM へ PhiX を希釈

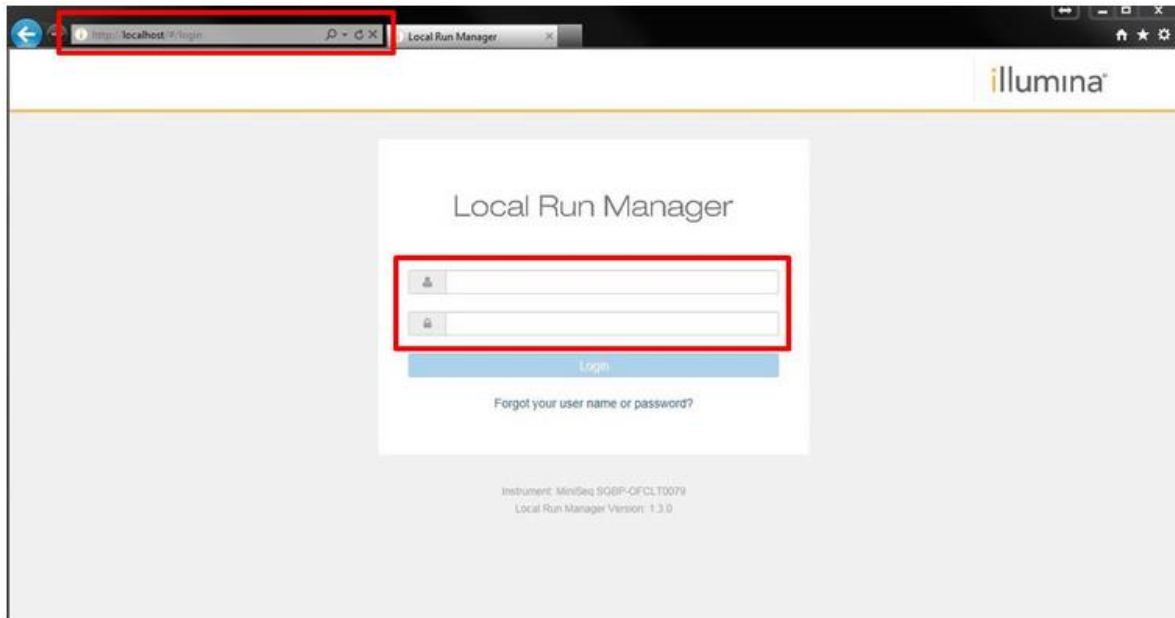
1. 変性後の PhiX 溶液に、氷冷した HT1 バッファーを 985 μ l 加える。
この操作により、1 ml の 20 pM PhiX 溶液が得られる。
2. 20 pM の PhiX 溶液を以下の比率で HT1 バッファーと混合し、1.5 pM に希釈する。
 - ・ 20 pM 変性済み PhiX (38 μ l)
 - ・ 氷冷した HT1 バッファー (462 μ l)この操作により、500 μ l の 1.5 pM PhiX 溶液が得られる。
3. 転倒攪拌で混合した後、スピンドウンする。

2. シーケンスランの設定

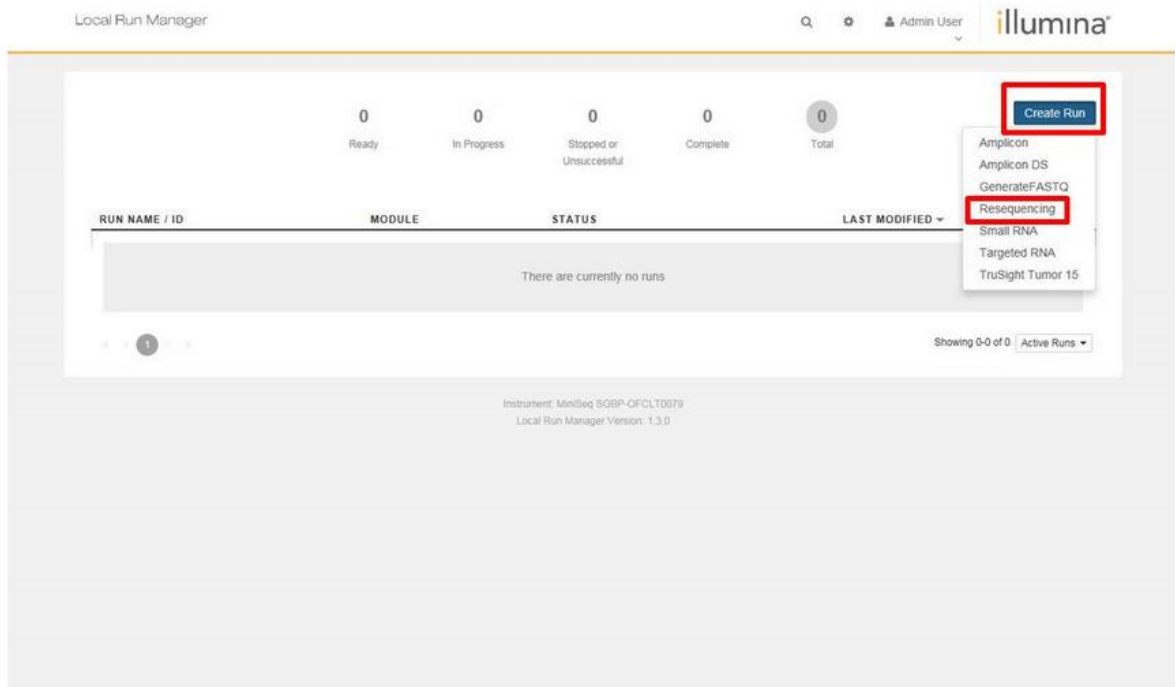
Local Run Manager、または BaseSpace Sequence Hub を利用する際の、ランの設定を記載する。

a. Local Run Manager (LRM) を利用の場合

1. LRM を開く。Cromium ブラウザのアドレスバーに'http://localhost'と入力し、adminID とパスワードで LRM にログインする。



2. 'Create Run'を選択し、ドロップダウンリストから'Resequencing'を選択する。



3. 赤線で囲った各パラメーターに、下記の情報を入力する。

- **Run Name:** PhiX Validation run
- **Library Prep Kit:** TruSeq LT
- **Index Reads:** 0
(PhiX はインデックス配列を持たないため、Index 1 または 2 を選択するとランが正常に完了しない原因となる)
- **Read Type:** Paired End
- **Read Length:** 26 cycle 以上を入力
(使用するシーケンス試薬キットのサイクル数に合わせて入力する)
- **Module-Specific Settings:** 変更せず、初期設定のままよい

Local Run Manager Q ⚙️ 👤 Illumina Adm... ▾

Create Run RESEQUENCING

| | |
|--|--|
| Run Name* <input type="text" value="PhiX Validation run"/> | Run Description <input type="text" value="Run Description"/> |
|--|--|

Run Settings

| Library Prep Kit* <input type="text" value="TruSeq LT"/> | Read Type* <input type="radio"/> Single Read <input checked="" type="radio"/> Paired End | | | | | | | | |
|---|---|---------|---------|---------|--------|-----|----|----|-----|
| Index Reads* <input checked="" type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 | <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"><thead><tr><th>READ 1</th><th>INDEX 1</th><th>INDEX 2</th><th>READ 2</th></tr></thead><tbody><tr><td>150</td><td>--</td><td>--</td><td>150</td></tr></tbody></table> | READ 1 | INDEX 1 | INDEX 2 | READ 2 | 150 | -- | -- | 150 |
| READ 1 | INDEX 1 | INDEX 2 | READ 2 | | | | | | |
| 150 | -- | -- | 150 | | | | | | |
| Custom Primers <input type="checkbox"/> Read 1 -- -- <input type="checkbox"/> Read 2 | | | | | | | | | |

Module-Specific Settings

| | |
|---|--|
| Aligner* <input type="text" value="BWA-MEM"/> | Flag PCR Duplicates* <input type="checkbox"/> On |
| Variant Caller* <input type="text" value="Starling"/> | Indel Realignment* <input type="checkbox"/> On |
| Export to gVCF* <input type="checkbox"/> Off | |

[Show advanced module settings...](#)

4. 画面下へスクロールし、Import Samples の項目にある、**Sample ID** 欄に'PhiX'と入力する。

5. **Genome Folder** 欄にて、SPECIES カラムから'PhiX'を選ぶ。

Module-Specific Settings

Aligner* Flag PCR Duplicates*

Variant Caller* Indel Realignment*

Export to gVCF*

[Show advanced module settings...](#)

Import Samples Template Export

| | SAMPLE ID* | SAMPLE DESCRIPTION | GENOME FOLDER* |
|---|------------|--------------------|----------------|
| 1 | PhiX | PhiX | |

+ 1 Rows

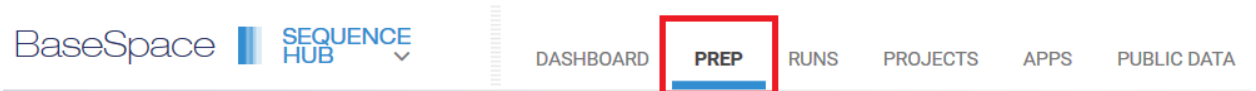
| SAMPLE ID* | SAMPLE DESCRIPTION | SPECIES | AGENCY | VERSION |
|------------|--------------------|----------------------------------|--------------|------------|
| | | New Custom Genome | AgencyName | VersionNum |
| | | PhiX | Illumina | RTA |
| | | Rattus_norvegicus | UCSC | m5 |
| | | Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1 | NCBI | 2005-10-07 |
| | | Saccharomyces_cerevisiae | UCSC | sacCer2 |
| | | Staphylococcus_aureus_NCTC_83... | NCBI | 2006-02-13 |
| | | XiaoLongBao | ShanghaiFood | Salty |

6. 'Save Run'を選択する。
7. ブラウザーを閉じて、MiniSeq Control Software の画面に戻る。
8. Available runs リストから、'PhiXvalidation run'を選び、シーケンスに進む。

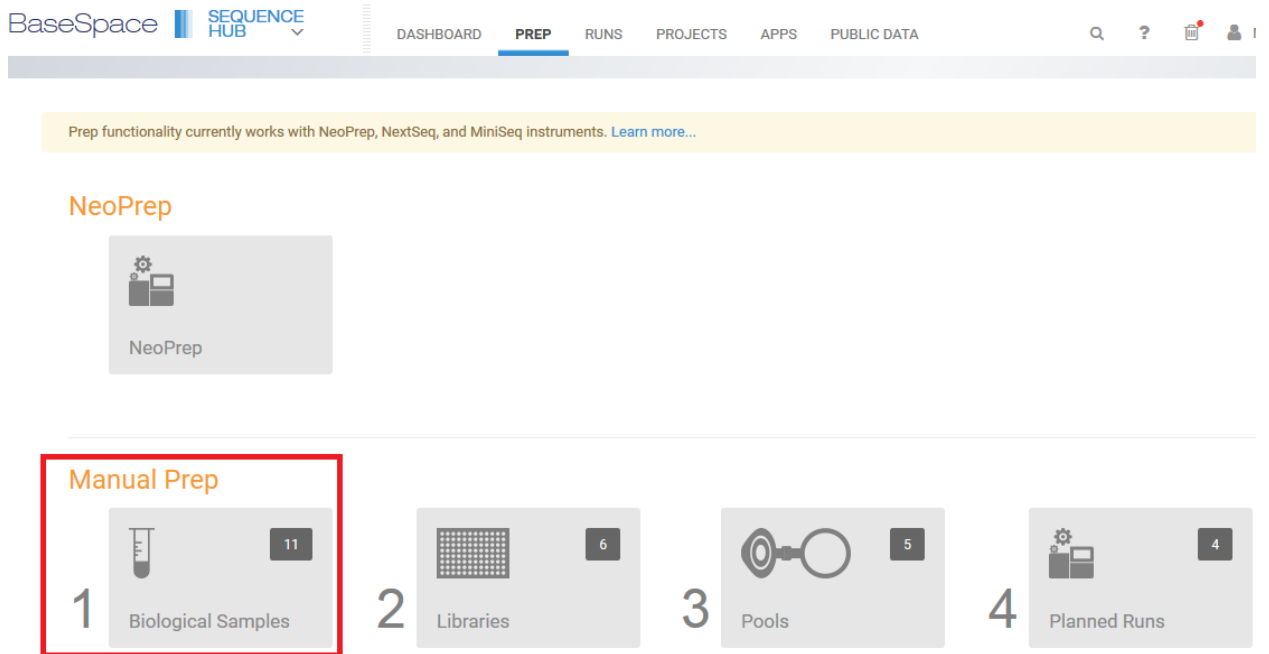
b. BaseSpace Sequence Hub を利用の場合

1. BaseSpace Sequence Hub にアクセスし、ログインする。
<https://basespace.illumina.com/dashboard>

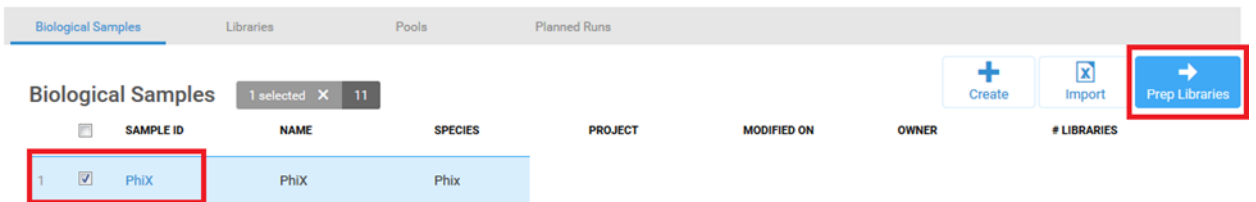
2. BaseSpace Sequence Hub の画面で、PREP タブをクリックする。



3. **Manual Prep - Biological Samples** を選択する。



4. a. 既に、SAMPLE ID に “PhiX” を作成している場合は、” PhiX” の隣にあるボックスにチェックを入れて、**Prep Libraries** を選ぶ。



4. b. SAMPLE ID に “PhiX” を作成していない場合は、**Create** を選び、下記の項目を設定する。Project の項目では、**New** を選び、プロジェクト名を” PhiX” とする。**Confirm** を選択してプロジェクトを作成し、**Prep Libraries** に進む。

Biological Samples Libraries Pools Planned Runs

Create Biological Sample

Sample ID*

Name*

Species

Project*

Nucleic Acid*

- Library Prep Kit に **TruSeq LT** を選択し、Plate ID を入力する。Libraries から PhiX を選び、ドラッグアンドドロップで Plate の 1 つ目のウェルに設定する。
Pool Libraries を選択し、次の画面に進む。

Biological Samples Libraries Pools Planned Runs

Prep Libraries

Library Prep Kit* Plate ID*

Notes

| SAMPLE ID | PROJECT | WELL | INDEX 1 | INDEX 2 |
|-----------|---------|------|---------------|---------|
| PhiX | PhiX | A01 | A001 - ATCACG | -- |

Plate

Auto Prep Clear Plate Index By Well ON OFF

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 A001 A002 A003 A004 A005 A006 A007 A008 A009 A010 A011 A012
 A013 A014 A015 A016 A018 A019 A020 A021 A022 A023 A025 A027

6. Plate からライブラリーを選び、ドラッグアンドドロップで Pools に移す。Pool のラベルを”PhiX”とし、**Plan Run** に進む。

The screenshot illustrates the workflow for moving a sample from a plate to a pool. The top panel shows a 96-well plate (labeled 'Plate ID: PhiX run') with a blue circle in well A01. To the right, a 'Pools' section contains a single sample icon labeled '#1' and a text box that says 'Drag your samples here'. A red arrow points from the blue circle in the plate to the sample icon in the pool. The bottom panel shows the same plate, but now with a red circle in well A01. The 'Pools' section has been updated to show '1 Samples' and the label 'PhiX'. At the bottom of the interface are three buttons: 'Cancel', 'Save & Continue Later', and 'Plan Run'.


7. ランを設定する。ランのリード長や各パラメータは、使用する試薬キットのバージョンやトラブルシュートの目的によって異なる。
例として、150 サイクルのペアエンドランを行う場合は、下記のように設定する。

Plan Run

Instrument*

MiniSeq  

Run Information

Name* 


Reagent Barcode


Use Custom Primer: R1 R2 Index

Enter Cycles

Single Read

Paired End 

Read 1 Cycles* 

Read 2 Cycles* 

Review Indexing

Override default indexing scheme


Single Index

Dual Index

No Index 

Index 1 Cycles

Index 2 Cycles

| | | | |
|--|-------------|-------------------|------------------------|
| #1  | 1 Libraries | Pool ID: PhiX run | Library Prep: TruSeqLT |
|--|-------------|-------------------|------------------------|

8. **Sequence** をクリックし、Planned Runs に保存する。