

# 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 の変性および希釈方法
2. シーケンスランの設定
  - サンプルシートの作成

## 1. PhiX コントロール DNA の変性と希釈方法

MiSeq 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。使用するキットのバージョンにより、最終的に後述の濃度に調製する；

MiSeq v2 試薬： 12.5 pM

MiSeq v3 試薬： 15 pM

### 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
HT1 (Hybridization Buffer), thawed and prechilled	Illumina, Provided in the MiSeq Reagent Kit
Illumina PhiX Control, Catalog# FC-110-3001	Illumina
1.0 N NaOH, molecular biology grade	General lab supplier
Tris-Cl 10 mM, pH 8.5 with 0.1 % Tween 20 (Qiagen 社の EB buffer で代用可)	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 1.0 N ストック溶液から希釈し直したものをを使用すること。  
※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。
- ・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、取扱い体積の小さいピペットでの 0.2 N NaOH の調製は避ける。P1000 ピペットを使用し、余分量 (1 ml) を作成する。

## 1. 使用する試薬の準備

以下の手順でライブラリーの変性、および希釈を行う。

0.2 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。

### 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 0.2 N NaOH 溶液を調製する。
  - ・ 分子生物学グレードの水 (MilliQ 水) (800  $\mu$ l)
  - ・ 1.0 N NaOH ストック溶液 (200  $\mu$ l)
2. 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 0.2 N NaOH 溶液を使用すること。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 0.2 N NaOH 溶液は廃棄する。

### b. HT1 の溶解

1. HT1 (Hybridization Buffer) を  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫から取り出し、室温で溶解させる。
2. 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  $4^{\circ}\text{C}$  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。

### a. PhiX を 4nM に希釈する

1. 以下の分量で溶液を混合し、PhiX ライブラリーを 4nM に希釈する。
  - ・ 10nM PhiX library (2  $\mu$ l)
  - ・ 10mM Tris-HCl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20 (3  $\mu$ l)この操作により、4 nM の PhiX 溶液 5  $\mu$ l が得られる。
2. 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

1. エッペンチューブ中で以下の分量で 4nM PhiX ライブラリーと新しく調製した 0.2 N NaOH を混合する。
  - ・ 4nM PhiX library (5  $\mu$ l)
  - ・ 0.2N NaOH (5  $\mu$ l)
2. 混合後の 2nM PhiX 溶液をボルテックスでよく攪拌する。
3. 軽く遠心 (280xg で 1 分程度) してチューブの底に溶液を回収する。

4. チューブを室温で5分間インキュベートし、PhiX DNA を一本鎖に変性する。
5. 変性後の PhiX 溶液と、氷冷した HT1 を以下の分量で混合し、20pM の PhiX 溶液 1 ml を作製する。
  - ・ 変性した PhiX 溶液 (10 μl)
  - ・ 氷冷した HT1 (990 μl)

NOTE

20 pM PhiX は-20°Cの冷凍庫で3週間まで保存可能である。  
3週間以上経つと、形成されるクラスター数が減少する傾向がある。

c. **Loading 濃度への希釈**

1. 変性済み 20pM PhiX 溶液を希釈する。  
V2 試薬でランする場合は、12.5 pM の PhiX 溶液 600 μl を、V3 試薬でランする場合は 15 pM の PhiX 溶液 600 μl を使用する。

最終濃度	V2 試薬 ( 12.5 pM )	V3 試薬 ( 15 pM )
20 pM PhiX DNA	375 μl	450 μl
氷冷 HT1	225 μl	150 μl

2. 何回か転倒攪拌して混合する。
3. 残った 0.2 N NaOH は廃棄する。

## 2. シーケンスランの設定

PhiX バリデーションラン用にサンプルシートを作成する。

### サンプルシートの作成方法

IEM を用いたサンプルシートの作成は、以下の内容で設定する。

各 Read のサイクル数は、使用するシーケンス試薬キットの最大サイクル数以下とする。

1. Illumina Experiment Manager(IEM)を起動する。
2. **Create Sample Sheet** をクリックし、**MiSeq** を選択して、**Next** をクリックする。
3. Sample Sheet Wizard – MiSeq Application Selection Category の画面で下記の項目を選び、**Next** で次に進む。

Select Category: **Other**

Select Application: **FASTQ Only**

4. 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（FASTQ Only Run Settings）の項目>

(a) ご使用の IEM が v1.13 または、それ以前のバージョンの場合

Reagent Cartridge Barcode: (使用する試薬カートリッジのバーコード番号を入力)

Library Prep Kit: **TruSeq LT**

Index Reads: **0**

※Experiment Name/Investigator Name/Description は任意で入力する。

Date:

Read Type: **Paired End**

※検証ランは、26 サイクル以上で行うこと。MiSeq Reagent kit v3 (600Cycle)を使用し、Read1 を 301 サイクル、Read2 を 301 サイクルで行う場合は、下記の通り。

Cycle Read 1: **301**

Cycle Read2: **301**

(b) ご使用の IEM が v1.14 または、それ以降のバージョンの場合

Reagent Cartridge Barcode: (使用する試薬カートリッジのバーコード番号を入力)

Library Prep Workflow: TruSeq Nano DNA

Index Adapters: TruSeq Single Indexes (A, B)

Index Reads: 0

※Experiment Name/Investigator Name/Description は任意で入力する。

Date:

Read Type: Paired End

※検証ランは、26 サイクル以上で行うこと。MiSeq Reagent kit v3 (600Cycle)を使用し、Read1 を 301 サイクル、Read2 を 301 サイクルで行う場合は、下記の通り。

Cycle Read 1: 301

Cycle Read2: 301

<画面右 (FASTQ Only Workflow-Specific Settings) の項目>

デフォルトで設定されている Use Adapter Trimming, Use Adapter Trimming Read2 にチェックを入れたままでよい。

5. Sample Sheet Wizard – Sample Selection の画面

**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。

Sample ID: **PhiX**

6. **Finish** をクリックし、保存する。