

## 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
  - Stand-alone 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

NextSeq™ 500 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、1.5 pM 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なものとなる。

Consumable	Supplier
HT1 (Hybridization Buffer)	Illumina, Component of NextSeq 500 Kit
PhiX, 10 nM	Illumina, catalog# FC-110-3002
RSB (Resuspension Buffer)	
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 1.0 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、取り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 NextSeq 向けのライブラリーを変性、および希釈する。

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。

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 0.2 N NaOH 溶液を調製する。
  - ・分子生物学グレードの水 (MilliQ 水) (800 µl)
  - ・1.0 N NaOH ストック溶液 (200 ul)

- チューブを何回か転倒攪拌し、中身を混ぜる。

NOTE

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**

- 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。
- 完全に溶けたら、NaOH で変性した PhiX の希釈に使用するまで  $4^{\circ}\text{C}$  に置いておく。

**c. RSB の溶解**

- RSB を  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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。

NOTE

PhiX を 2 週間以上保存する場合には、4 or 10 nM の濃度で  $-20^{\circ}\text{C}$  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 ライブラリーを 4 nM に希釈する。

- ・ 10 nM PhiX library (2  $\mu\text{l}$ )
- ・ RSB (3  $\mu\text{l}$ )

この操作により、4 nM の PhiX 溶液 5  $\mu\text{l}$  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、 $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ l)
  - ・ 新しく調製した 0.2 N NaOH (5  $\mu$ 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 分のインキュベートが終わったら、ボルテックスで軽く攪拌する。
5. サンプルの入ったチューブを 280xg で 1 分間遠心する。
6. 5  $\mu$ l の 200 mM Tris-HCl(pH=7.0)を PhiX 溶液に加える。
7. 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、985  $\mu$ l の氷冷した HT1 溶液を加える。これにより、1 ml の 20 pM PhiX 溶液が得られる。
2. ボルテックスで軽く攪拌する。

### NOTE

20 pM 溶液は -20°C で 2 週間まで保管できる。

2 週間以上経過すると、保管前と比べてクラスター形成数が低下する。

3. 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 (98  $\mu$ l)
  - ・ 氷冷した HT1 バッファー (1202  $\mu$ l)

この操作により、1300  $\mu$ l の 1.5 pM PhiX 溶液が取得できる。

## 2. シーケンスランの設定

Stand-alone モードまたは、BaseSpace Sequence Hub を利用の場合の、ラン条件の設定について記載する。

### a. Stand-alone を利用の場合

1. NextSeq Control Software(NCS)を開く。
2. 'Sequence'を選択する。
3. 画面の案内に従い、シーケンス用フローセル、空の廃液トレイ、試薬カートリッジとバッファカートリッジをロードする。
4. **Run Setup** の画面で、ラン条件を設定する。

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ットの目的によって異なる。

例として、75 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。

PhiX コントロール DNA はインデックス配列を持たないため、**Index1** と **Index2** の項目の値は '0' とする。

Load > **Run Setup** > Check > Sequence

Enter the run parameters. When complete, select Next.

<b>Run Name</b>	PhiX Validation			
<b>Library ID</b>				
<b>Recipe</b>	TruSeq LT			
<b>Read Type</b>	<input type="radio"/> Single Read		<input checked="" type="radio"/> Paired End	
<b>Read Length</b>	Read 1	Read 2	Index 1	Index 2
	75	75	0	0
<b>Custom Primers</b>	<input type="checkbox"/> Primer 1	<input type="checkbox"/> Primer 2	<input type="checkbox"/> Primer 3	

Back Exit Next

5. Output folder のロケーションを確認する。
6. ランのセットアップ完了後に、装置の各種セルフチェックに進む。
7. セルフチェックを終えたら、'Start'を選択し、PhiX バリデーションランを開始する。

## b. BaseSpace Sequence Hub を利用の場合

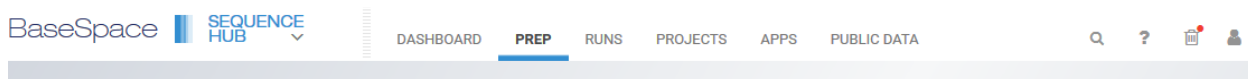
1. BaseSpace Sequence Hub にアクセスし、ログインする。

<https://basespace.illumina.com/dashboard>

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

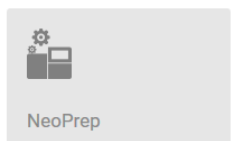


3. **Manual Prep – Biological Samples** を選択する。

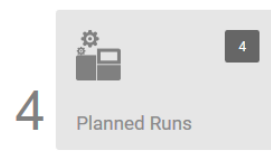
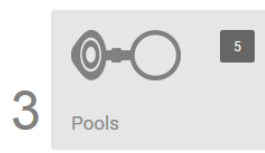
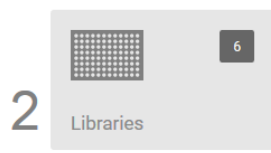
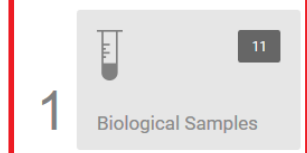


Prep functionality currently works with NeoPrep, NextSeq, and MiniSeq instruments. [Learn more...](#)

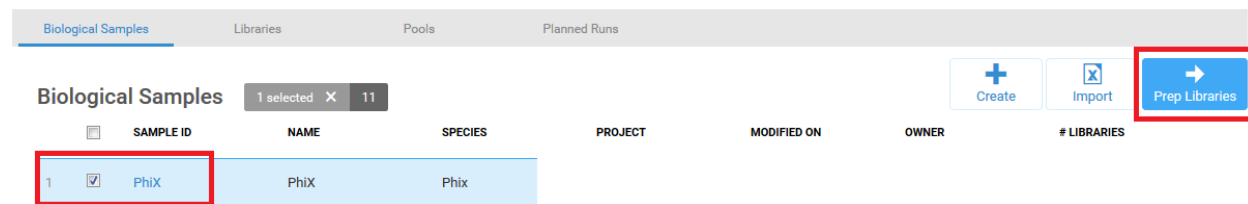
### NeoPrep



### Manual Prep



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\* Select Project(s):

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

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 in two stages. In the top stage, a 96-well plate (labeled 'Plate ID: PhiX run') has a blue circle in well A01. A red arrow points from this well to the 'Pools' section on the right, which contains a 'Drag your samples here' area with a '#1' icon. In the bottom stage, the blue circle in well A01 has turned red, and the '#1' icon has been moved to the 'Pools' section. The pool now displays '#1' with a magnifying glass icon, '1 Samples', and a text input field containing 'PhiX'. At the bottom of the interface, there 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\*

NextSeq 



### Run Information

Name\*

PhiX Validation run

Reagent Barcode

Use Custom Primer:  R1  R2  Index

### Enter Cycles

Single Read

Paired End

Read 1 Cycles\*

150

Read 2 Cycles\*

150

### Review Indexing

Override default indexing scheme

Single Index

Dual Index


No Index

Index 1 Cycles

0

Index 2 Cycles

0

#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。