

HiSeq 2500 Rapid Run Mode Quick Reference Guide

Rapid Sequencing Workflow



試薬およびライブラリを用意する。このステップには、すべての試薬の解凍および混合と、最適濃度へのライブラリサンプルの希釈を含む。

ワークフローは、Template Hybridization を cBot で行うか、HiSeq 上で行うかによって変わる。各セクションを正しく参照すること。



HiSeq Control Software(HCS)を用い、ラン前の送液チェックと、実施するランのパラメータ入力を行う。



On-board Cluster Generation(OBCG)を行う場合は、ランスタート時に Clustering, SBS, PR turn, Index 試薬およびライブラリサンプルを装置にロードする。

Cluster Generation を cBot で行う場合は、すべての試薬類を装置にセットするが、ライブラリサンプルを装置にロードする必要はない。



Cluster Generation を cBot で行った場合、HiSeq 上で、使用済みフローセルを用いて Clustering 試薬の Priming を行う必要がある。

OBCG を行う場合は、すべての試薬の Prime はランスタート後に新しいフローセルを通じて実施される。



シーケンスをスタートする。Cycle1 終了後、1st Cycle Report(オプション設定)を確認し、Read1 を継続する。

シーケンスは、中断することなく PE turn および Read2 が継続して行われる。



ランが終了したら、試薬をはずして重さを測定する。

表示される指示にしたがって Post run Wash を行う。Post Run Wash 後、装置は使用する用意ができている。Maintenance wash が必要な場合は、HCS が自動的にその指示を表示する。これは 10 日に一度、もしくはモード変更時に表示される。

Approximate Run Duration

以下の表は、長さおよび装置のシリアル番号における、Rapid シーケンスランの平均ラン所要時間である。

Run Format	HCS v2.0 in Rapid Run Mode on instruments with a serial number greater than 700895*
36	Approx. 7 hours
2 x 50	Approx. 16 hours
2 x 100	Approx. 27 hours
2 x 150 Cycles	Approx. 40 hours

*装置のシリアル番号が 700895 以下の装置での Rapid Run では、より長い時間がかかる。

Preparing SBS and Cluster Reagents

(注意)

OBCG(On-Board Cluster Generation)または、cBot でのテンプレートハイブリのどちらを行うかによらず、以下のセクションに従って、同じ Clustering および SBS 試薬の調整を行う。

もし cBot でのテンプレートハイブリを行う場合は、Denature Library for On-Instrument Clustering のセクションをスキップすることができる。

Rapid Run モードを行う場合、Hiseq は、sequencing primers を 1 つのチューブからのみ吸い込む。つまり、Hiseq の Rapid Run モードにおいては、各プライマーハイブリのステップにおいて、ある一つのチューブの sequencing primer だけのみ用いることができる。すなわち、Rapid フローセルの両レーンでは、必ず同じ Sequencing primer を必要がある。

ランのセッティングアップの最初のステップは、SBS 試薬の準備である。試薬の準備には、2-8°Cでのオーバーナイト、もしくは、室温のウォーターバスでの 90 分程度の解凍時間が必要となる。試薬が完全に解凍したら、試薬は使用準備が整う。Rapid Run Mode において、Incorporation Mix の、別途調整は不要である。

SBS Kits for Dual-Indexed Sequencing

200-cycle kit 1 つは、最長 225 cycle 分のシーケンスに十分な試薬が含まれる。50-cycle kit 1 つには、最長 75 cycle 分のシーケンスに十分な試薬が含まれる。合計で 225 cycle を超えるランを行う場合は、他のリード長実施のために、試薬使用効率を最大化するには、50-cycle キットを複数用いる。2x151 cycle のランの場合、イルミナは、1.5 x 200-cycle kit もしくは、1x 200-cycle + 2x 50-cycle kit の組み合わせを推奨する。

以下の表では、dual-Indexed ランにおける、必要キットの数をリスト化している。Dual-Indexed paired-end ランでは、cycle 数の合計に 7cycle 分の chemistry-only cycle 分を加算する必要がある。

Table 12 Kit Combinations for Indexed Runs

Run Type	Run Cycles	Total Cycles	Kit Combination 1		Kit Combination 2		Kit Combination 3		Kit Combination 4	
			200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits
Dual-Indexed Paired-End	151+8+(7)+8+151	325	2	-	1.5	-	1	2	-	4
	101+8+(7)+8+101	225	1	-	-	3	-	-	-	-
	93+8+(7)+8+93	209	1	-	-	3	-	-	-	-
	76+8+(7)+8+76	175	1	-	-	2	-	-	-	-
	51+8+(7)+8+51	125	-	2	-	-	-	-	-	-
	36+8+(7)+8+36	95	-	2	-	-	-	-	-	-
Dual-Indexed Single-Read	151+8+8	167	-	2	-	-	-	-	-	-
	101+8+8	117	-	2	-	-	-	-	-	-
	93+8+8	109	-	2	-	-	-	-	-	-
	76+8+8	92	-	2	-	-	-	-	-	-
	51+8+8	67	-	1	-	-	-	-	-	-
	36+8+8	52	-	1	-	-	-	-	-	-

(注意)

2x151 run (Indexing の有無にかかわらず)のために試薬を混ぜる場合、各 USB ボトルを、200mL にする。このとき、試薬の補充は不要である。残った USB はしっかりと蓋をして、2-8°C で最長 7 日間保存できる。

その他の残った SBS 試薬は、ランが終了したらすべて廃棄する。次回使用のために保存することはできない。

SBS Kits for Non-Indexed Sequencing

200-cycle kit 1 つは、最長 225 cycle 分のシーケンスに十分な試薬が含まれる。50-cycle kit 1 つには、最長 75 cycle 分のシーケンスに十分な試薬が含まれる。合計で 225 cycle を超えるランを行う場合や、他のリード長実施のために、試薬使用効率を最大化したい場合は、50-cycle キットを複数用いる。2x151 cycle のランの場合、イルミナは、1.5 x 200-cycke kit もしくは、1x 200-cycle + 2x 50-cycle kit の組み合わせを推奨する。

以下の表では、Non-Indexed ランにおける、必要キットの数をリスト化している。

Table 13 Kit Combinations for Non-Indexed Runs

Run Type	Run Cycles	Total Cycles	Kit Combination 1		Kit Combination 2		Kit Combination 3		Kit Combination 4	
			200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits	200-cycle kits	50-cycle kits
Paired-End	151+151	302	2	-	1.5	-	1	1	-	4
	101+101	202	1	-	-	3	-	-	-	-
	93+93	186	1	-	-	3	-	-	-	-
	76+76	152	1	-	-	2	-	-	-	-
	51+51	102	-	2	-	-	-	-	-	-
	36+36	72	-	1	-	-	-	-	-	-
Single-Read	151	151	1	-	-	2	-	-	-	-
	101	101	-	2	-	-	-	-	-	-
	93	93	-	2	-	-	-	-	-	-
	76	76	-	2	-	-	-	-	-	-
	51	51	-	1	-	-	-	-	-	-
	36	36	-	1	-	-	-	-	-	-

(注意)

2x151 run (Indexing の有無にかかわらず)のために試薬を混ぜる場合、各 USB ボトルを、200mL にする。このとき、試薬の補充は不要である。残った USB はしっかりと蓋をして、2-8°Cで最長7日間保存できる。

その他の残った SBS 試薬は、ランが終了したらすべて廃棄する。次回使用のために保存することはできない。

Thaw SBS Reagents

(注意)

CRM は、他の SBS 試薬と分けて溶解すること。

1. IMM, SRM および USB を -15-25°C の保管庫から取り出し、溶解する。その後、以下の表の指示に従って混合する。

(注意)

USB のみ、2-8 度に保存しておくことが可能。その場合、保管庫から取り出した後、5 回転倒混和し、すぐに使用することが可能となる。使用準備ができるまで、室温においておく。

試薬名	SBS kit (200 cycles)	SBS kit (50 cycles)
IMM	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 90 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで氷上に置く。	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 60 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで氷上に置く。
SRM	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 90 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで氷上に置く。	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 60 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで氷上に置く。
CRM	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 90 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 IMM および SRM と分けて、使用するまで氷上に置く。	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 60 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 IMM および SRM と分けて、使用するまで氷上に置く。
USB (1 フローセルにつき 2 本)	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 90 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで室温に置く。	2-8°C で、16 時間かけて溶解。もしくは、室温のウォーターバスに浸して 60 分かけて溶解する。 5 回転倒混和する。 使用するまで室温に置く。

2. 使用前に、各試薬が完全に解凍していることを確認すること。
3. Lab Tracking Form に、各試薬のロット番号を記録する。

Thaw Clustering Reagents

1. 以下の試薬を-15--20°Cの保管庫から取り出し、溶解して、以下の表の指示に従って混合する。

試薬名	Truseq Rapid PE Cluster Kit	Truseq Rapid SR Cluster Kit
FRM	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。	--
FLM2	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。	--
FLM1	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。	--
FLS	--	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。
AMS	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで氷上に置く。
FPM	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。
FDR	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。
HP9	--	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。
HP10	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。
HP11	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。	--
HP12	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。	室温のウォーターバスに 60 分浸して溶解する。 5回転倒混和する。使用するまで室温に置く。

2. 使用前に、各試薬が完全に解凍していることを確認する。

Denature Library for On-Instrument Clustering

(注意)

cBot でテンプレートハイブリを行う場合は、以下のセクションのステップはスキップすることができる。

このステップは、HiSeq2500 上で、テンプレートハイブリを行う場合にのみ実施する。以下のステップに従って、0.1N NaOH を用いてテンプレート DNA を変性し、最終 DNA 濃度 20pM に整える。

(注意)

もし、実施するアプリケーションにおいて、自身のライブラリの最終濃度を 20pM よりも高くしたい場合、変性時の反応組成において、NaOH 濃度が 0.05N 以上にならないようにし、HT1 で希釈した最終 DNA 希釈溶液内の NaOH 濃度が 0.001N (1mM) 以上にならないようにする。

NaOH の含有量が高すぎると、フローセルへのライブラリのハイブリが阻害され、クラスター密度が減少するので注意する。

Illumina Supplied Consumables

- ▶ HT1 (解凍したら氷上に置いて冷やしておく。= Pre-chilled HT1)

User Supplied Consumables

- ▶ 1N NaOH
- ▶ 1.5mL もしくは 1.7mL チューブ (使用可能なチューブは後に出てくる表を参照すること)

Procedure

- 以下の組成で、テンプレートDNAライブラリと、0.1N NaOHを、1.5mLチューブで混ぜる。

• 2nM template DNA (10uL)	}	1nM DNA, 0.05N NaOH / 20uL
• 0.1N NaOH (10uL)		
- テンプレート溶液を短くボルテックスする。
- テンプレート溶液を280 x g で1分、遠心してスピンドウンする。
- 室温で5分置いて変性し、テンプレートDNAをシングル鎖にする。
- 変性済みテンプレート(Temp)を、980uLの、pre-chilledしたHT1(Hybridization buffer)の入ったチューブに全量移す。

Diluting Denatured DNA

以下のステップで、変性済みDNAテンプレートをpre-chilled HT1で希釈する。

1. 1.5mLまたは1.7mLチューブを用い、変性済みDNA溶液が、目的濃度かつ420uL容量になるよう、以下の例を参考にして希釈する。

Required Concentration	20 pM template (μl)	HT1 (μl)
2 pM	42	378
6 pM	126	294
10 pM	210	210
12 pM	252	168
16 pM	336	84
20 pM	420	0

2. 数回転倒混和し、テンプレート溶液を軽く遠心してスピンドウンする。
3. 変性済みテンプレートDNA溶液は、装置に設置する用意ができるまで、氷上に置く。テンプレートの設置については、*Load SBS and Clustering Reagents and Template* の項を参照する。

Preparing Indexing Reagents

Rapid Runモードでは、別のIndexingキットを用いる必要はない。すべてのRapid Run用Indexing 試薬は、PE用およびSR用のClustering kitに含まれている。

Thaw Indexing Reagents

1. Indexing試薬(HP9 –i5 indexing primer, HP12 –i7 indexing primer, FRM)を、2-5°Cで16時間、もしくは室温のウォーターバスに1時間浸して解凍する。
2. 5回転倒混和する。
3. 軽く遠心してすべての溶液をチューブの底に集める。
4. ランスタート時に、他のすべてのSBSおよびClustering 試薬とともに、装置にセットする。

Checking Pre-Run Fluidics and Run Parameters

Hiseq Control Software (HCS)は、ランの各セットアップをガイドする。Rapid Runモードを選択していることを確認すること。

(注意)1,2,3,6,7,8の廃液ラインの先端を、1Lサイズの、ミリQ水の入ったコンテナに差し込むこと。もしこの操作を行わないと、試薬ポンプがダメージを受けることがあるので注意する。

HCSの **Welcome** スクリーンから、 **Sequence → New Run** を選択する。Pre Run Fluidics Check スクリーンが開く。イルミナは、ランスタート前に、装置の正常な動作を確認するために、送液チェックを行うことを推奨している。

Volume Check Screen

Rapid Run モードにおいてのみ、Volume Check スクリーンが表示され、pre-run の送液チェックを行うことが可能。

ランスタート時に、送液チェックを行うために、Yes を選択すると、HCS は各試薬位置に MilliQ 水を設置し、使用済みフローセルを設置するよう促す。使用済みフローセルを用いた送液チェックでは、water wash と同じレシピが走る(大よそ~12分程度を要する)。チェックが終了すると、次のスクリーンへの Next ボタンがアクティブになる。

1. フローセルのロットと対応するすべての 8 つの SBS ポジションと、10 個の Clustering ポジションに、ラボラトリーグレードの水(MilliQ 水)の入ったチューブを設置する。使用済みの Rapid Run フローセルが、装置に設置されていることを確認し、送液チェックを行う。

(注意)

送液チェックを行う前に、4 と 5 番の廃液ラインを 15mL のチューブに刺す。想定される廃液量はフローセルの各レーンで、9.5mL である。

Storage Screen

1. データを、BaseSpace のアカウントに保存したい場合は、**Use BaseSpace for storage and analysis** を選択する。このオプションを選択した場合、My illumina アカウント用の e-mail アドレスとパスワードを入力するよう促される。

(注意)

各ランにおいて、Hiseq2500 は、一般的なランの Metrics を BaseSpace に送付しようとする。この Metrics は、Interoperation files (SAV 用ファイル)と、RunInfo.xml および RunParameteras.xml ファイルのような一般的なファイルを含む。このとき、シーケンス実データは送付されず、その Hiseq2500 からのデータはユーザーではなく、装置に関連付けられて送付されるので、匿名化されている。

この機能は、デフォルトで On になっており、On のままにしておくことをイルミナは推奨している。設定を無効にするには、**Menu → Tools → Options** の画面から、**Send System health information to Illumina to aid technical support** の項目のチェックをはずせばよい。

2. **Save to an output folder** の項目から、ランフォルダ保存先をブラウザして選択する。
3. ランのために必要となる保存先フォルダの空き容量を減らしたい場合は、**Zip BCL files** を選択する。BaseSpace を使う場合、この設定はデフォルトで選択される。

(注意)

BaseSpace を用いたり、アップデートされたバージョンの CASAVA をデータ解析の際に用いる場合は、Zipping BCL files の設定は必須となる。

4. ランのために必要となる保存先フォルダの空き容量をさらに減らしたい場合は、**Bin QScores** を選択する。
5. **Save Auxiliary Files** のドロップダウンリスト項目から、どちらかのセッティングを選択する。
 - **Save All Thumbnails:** Tile レベルと、全体像の両方のサムネイルを保存する。
 - **Save Tile Thumbnails:** Tile レベルのサムネイルのみを保存する。
6. **Next** を選択する。

Flow Cell Set-up Screen

(注意)

セットアップの際、ランに用いるフローセルのバーコードをスキャンする、もしくはフローセル ID を正しく手入力することは非常に重要となる。HCS は、フローセル ID を元に、フローセルのタイプと、試薬の適合性を確認する仕様になっている。

1. シーケンスに用いるフローセルのバーコードをスキャンする、もしくはフローセル ID(バーコード番号)を手入力する。
2. フローセル ID に対応して自動的に表示されたフローセルのタイプを確認する。
3. Experiment name(実験名)および User name を入力する。
4. **Next** を選択する。

Advanced Screen

1. 1st base report の確認を行う場合は、**Confirm First Base** のチェックボックスにチェックを入れる。
2. Control Lane をもちいる場合は、**Control Lane** のドロップダウンリストから Control を含んでいるレーン番号を選択する。使用しない場合は **None** を選択する。
3. 必要に応じて、フローセルの各レーンに対し、Align to PhiX のチェックを入れる。
4. 後日再解析に用いる場合は、Keep Intensity Files にチェックを入れる(オプション設定)
5. **Next** を選択する。

Recipe Screen

- 以下の Indexing のオプションから、1つ選択する。
 - No Index – None-Indexed の Single-read もしくは Paired-end のランを行う場合。
 - Single Index – 1 Index read(Index1(i7) read)を付けた、Single-read もしくは Paired-end のランを行う場合。
 - Dual Index -- 2 Index reads (Index1(i7) read と Index2(i5) read) を付けた、Single-read もしくは Paired-end のランを行う場合。
 - Custom – カスタムの cycle 数の Index read を付けた、Single-read もしくは Paired-end のランを行う場合。
- フローセルのフォーマットとして、**Single Read** か、**Paired End** のどちらかを選択する。
- 実施するシーケンスの長さに応じて、read1 と read2 の **Cycles** に cycle 数を入力する。

Custom の Index option を選択した場合は、Index read の cycle 数も入力する。

(注意)

Custom recipe を選択した場合、cycle 数は、レシピによって決まり、HCS 上の Cycles は入力不能になる。

(注意)

Paired-end 型のライブラリをつけた Paired end 用フローセルで、dual-indexed single-read ランを行うことも可能である。この場合は、Dual-indexed paired-end run を選択した後、Read2 の Cycles に、0 を入力する。これにより、Index2(i5)のリード後、ランはストップする。

- Use Existing Recipe のチェックボックスは、カスタムレシピを用いたいときのみ選択する。それ以外の場合は、Run setup スクリーンで設定した情報に基づき、レシピが作成される。

Sample Sheet Screen

(注意)

Sequencing Analysis Viewer(SAV)で Index の結果を確認したり、BaseSpace を用いるためには、スタート時に対応する Samplesheet をロードすることが必須となる。正しく Index 情報を表示するためには、SAV の v1.8 以上が必要となる。

- Samplesheet までのパスをブラウザするか、手入力する。Indexed ランにおいて、SAV で Index の情報を表示させたい場合は、samplesheet が必要となる。また、BaseSpace を用いる場合も必要となる。
- HiSeq 上での On-board cluster generation を行う場合は、**On-board cluster generation** を選択する。cBot でのテンプレートハイブリを行った場合は、**Template Hybridization on cBot** を選択する。
- Next** を選択する。

Reagents Screen

- Reagent Kit ID の項目に、使用する SBS キットの ID をスキャンして入力する。
- Cluster Kit ID の項目に、使用する Cluster キットの ID をスキャンして入力する。

3. ランに使用する SBS kit の cycle 数を選択する。
 - ・ 200cycle kit のとき、200cycles を、 50 cycle kit のとき、50cycles を選択する。

(注意)

2x151 ランとして、複数の SBS kit を混合した場合は、Used Kit を選択して、Cycle remaining の項に、合計の cycle 数を手入力する。
 4. Cycles Remaining の項は、用いる SBS 試薬の選択に応じて自動的に入力される。一部のキットを用いる場合は、複数キットを混ぜた場合は、Used kit を選択して、Cycles remaining に期待される cycle 数を入力する。cycle 数が少なくなると、HCS は自動的に新しい SBS 試薬を足すように促す仕様になっている。
- (注意)
- 中途使用の試薬を用いてシーケンスを行う場合は、新しい試薬が必要となるタイミングで、装置前に待機する必要がある。

Review Screen

ラン情報をレビューする。正しければ **Next** を選択。変更したい項目がある場合は、**Back** を選択する。

Loading and Priming Reagents

次のステップは、シーケンス試薬の設置である。HCS のインターフェイスは、各過程をガイドする。

Load SBS and Clustering Reagents and Template

装置に SBS 試薬を設置する前に、各試薬が完全に解凍していることを確認する。

Illumina-Supplied Consumables

- ▶ Eight funnel caps (Provided in the SBS Kit)

User-Supplied Consumables

- ▶ 250 ml bottle (Corning, catalog # 430776) 3個
- ▶ 1.5mLまたは1.7mLのOne flip-top eppendorf tube 2個(dual FCのとき)

HiSeq2500で使用可能なエッペンドルフチューブは以下の表のとおり。スクリーキャップチューブは使用不可。

Consumable	Supplier	Purpose
MicroCentrifuge Tube, 1.5mL	VWR, catalog #20170-038	Sample(template) loading and washing the template fluidics line.
MicroCentrifuge Tube, 1.7mL, capless	VWR, catalog #20170-575	
MicroCentrifuge Tube, 1.5mL	VWR, catalog #20170-650	
MicroCentrifuge Tube, 1.5mL	VWR, catalog #89000-028	
MicroCentrifuge Tube, 1.5mL	AXYGEN, catalog #MCT-150-C	
MicroCentrifuge Tube, 1.7mL	AXYGEN, catalog #MCT-175-C	
MicroCentrifuge Tube, 1.7mL	So renson BioScience, catalog #16070	

Procedure

1. 各試薬の重さを測定し、Lab Tracking Formに記入する。

(注意)

シーケンスランの前と後に試薬の重さを測定することで、正しく送液されていたかどうかを確認する。

2. 試薬コンパートメントのドアを開ける。
3. シーケンス試薬ラックのシッパを上げる。
4. 試薬ラックをスライドして、試薬コンパートメントから取り出す。
5. 各試薬を、以下の表に従い、試薬ラックの対応する番号位置に入れる。

(注意)

ラインの乾燥を防ぐために、シングルリードフローセルの場合は、位置2,4,8,10,11,12に。ペアエンドフローセルの場合は、2,4,8,19に、MilliQ水の入ったチューブを入れる。

Single read フローセルの試薬位置

Table 14 Single Read Flow Cell Positions

Position	Reagent	Description
1	IMM	Incorporation Master Mix
2	PW1 (25ml)	Wash Buffer
3	SRM	Scan Reagent Master Mix
4	PW1 (25ml)	Wash Buffer
5	USB	Universal Sequencing Buffer
6	USB	Universal Sequencing Buffer
7	CRM	Cleavage Reagent Master Mix
8	PW1 (25 ml)	Wash Buffer
10	PW1 (10 ml)	Wash Buffer
11	PW1 (10 ml)	Wash Buffer
12	PW1 (10 ml)	Wash Buffer
13	AMS	Fast Amplification Mix
14	FPM	Fast Premix
15	FDR	Fast Denaturation Reagent
16	HP9	i5 Index Primer
17	HP12	i7 Index Primer
18	HP10	Read 1 Primer
19	FLS	Fast Linearisation Solution
Sample Loading Station Template	Template	420 µl in 1.5 or 1.7 ml microcentrifuge tube at required concentration

位置2,4,8,10,11,12はMilliQ水をセット

Paired endフローセルの試薬位置

Table 15 Paired End Flow Cell Positions

Position	Reagent	Description
1	IMM	Incorporation Master Mix
2	PW1 (25 ml)	Wash Buffer
3	SRM	Scan Reagent Master Mix
4	PW1 (25 ml)	Wash Buffer
5	USB	Universal Sequencing Buffer
6	USB	Universal Sequencing Buffer
7	CRM	Cleavage Reagent Master Mix
8	PW1 (25 ml)	Wash Buffer
10	FRM	Fast Resynthesis Mix
11	FLM2	Fast Linearisation Mix 2 (read 2)
12	FLM1	Fast Linearisation Mix 1 (read 1)
13	AMS	Fast Amplification Mix
14	FPM	Fast Premix
15	FDR	Fast Denaturation Reagent
16	HP11	Read 2 Primer
17	HP12	i7 Index Primer
18	HP10	Read 1 Primer
19	PW1 (10 ml)	Wash Buffer
Sample Loading Station Template	Template	420 µl in 1.5 or 1.7 ml microcentrifuge tube at required concentration

位置2,4,8,19はMilliQ水をセット

Loading the Template

(注意)

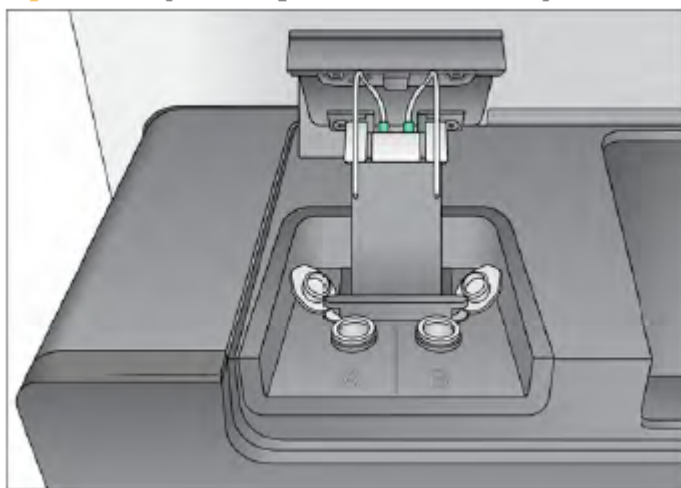
OBCGを使用する場合は、このテンプレートチューブを設置するステップが必要となる。

1. HCSIは、たの試薬の設置と同時に、テンプレートチューブのロードを促す表示を出す。これに従い、サンプルローディングステーションのドアを開け、420uLの希釈したテンプレートライブラリの入ったエッペンドルフチューブを以下の図のように設置する。シッパーやサンプル同士がコンタミしないよう、気を付ける。

(注意)

過剰な液量のテンプレートをチューブに入れなないこと。ラン終了後に、ウォッシュのため、エッペンドルフチューブへ向けて500uLのH₂Oが逆流する。あふれないように気をつける。

Figure 47 Sample Loading Station With the Door Open



2. 設置し終わったら、サンプルローディングステーションのドアをゆっくりと閉める。

Priming Reagents

(注意)

cBotでのテンプレートハイブリダイゼーションのレシピを用いた場合は、この試薬のPrimingステップが必要となる。

User-Supplied Consumables

- ▶ レンズ紙
- ▶ 必要に応じて、70% ethanol または alcohol wipes
- ▶ 使用済みflow cell

Procedure

1. フローセルホルダーをきれいにする。汚れが強い場合は、濡らしたレンズ紙で拭く。
2. HCSの指示に従い、使用済みフローセルのIDを入力する。
3. 使用済みフローセルを装置にセットする。バキュームが正常に動き、ランプが緑になったら、Nextを選択する。
4. 2番のWater の試薬位置を選択する。以下のセッティングで、Pumpを押し、流量をチェックする。
 - ・ Volume: 250
 - ・ Aspirate Rate: 1500
 - ・ Dispense Rate: 2000
5. フローセルの各レーンをながれる泡の状態を確認し、フローセルが正しく装置に設置されていることを確認する。過剰な泡が流れる場合は、ガスケットによごれがないかなどを確認し、必要に応じて付け変える。
6. 廃液量測定のため、廃液ラインの4,5番をそれぞれ空の15mLチューブに刺す。1-3,6-8のチューブが、MilliQ水に使っていることを確認する。
7. Nextを選択し、Primeが終了するのを待つ。Primingの廃液期待値は、2.5mL。
8. 液量を確認したら、4.5番の廃液ラインを、廃液ボトルに戻す。
9. Nextを選択すると、フローセルを設置する画面に移動する。

Loading a Flow Cell

(注意)cBotでのプレートハイブリを行った場合は、そのフローセルをセットする。OBCGの場合は、新しいフローセルを設置する。

1. 使用済みフローセルをとりはずす。
2. フローセルホルダーをきれいにする。
3. シーケンスに用いるフローセルの表面を、MilliQ水を用いてリンスし、レンズ紙をもちいて磨く。必要に応じて、アルコールで拭く。
4. フローセルを、HiSeqの所定位置にセットする。
5. バキュームが正常に動き、ランプが緑になったら、**Next**を選択する。
6. 5番のUSB の試薬位置を選択する。以下のセッティングで、**Pump**を押し、流量をチェックする。
 - ・ Volume: 250
 - ・ Aspirate Rate: 1500
 - ・ Dispense Rate: 2000
7. 流量チェックが終了したら、**Next**を選択する。
8. フローセルステージのドアを閉める。**Vacuum Engaged**と**Door Closed**のチェックボックスにチェックが入っていることを確認し、**Next**を選択する。
9. **Start** を選択すると、ランが開始される。