



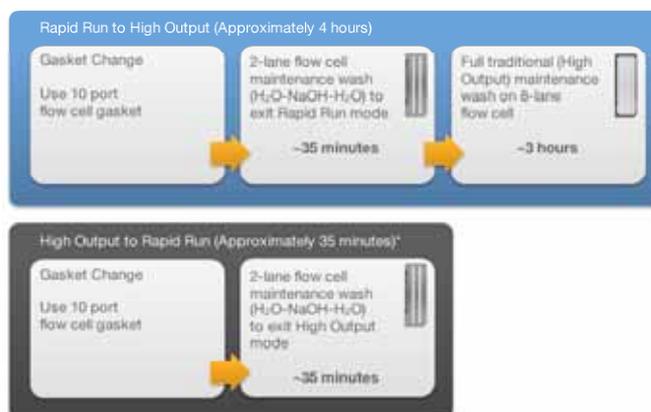
# Setting Up A Run on HiSeq Control Software (HCS2.0)

illumina

1

## 立ち上げ画面：モード選択

- ▶ Rapid Run とHigh Outputの2つのモードが選択可能
  - 前回のランに使用したモードのボタンにハイライトが入っている
  - モードの切り替えには、ウォッシュが必須。HCSが自動的に必要なウォッシュをガイドする。
  - **Rapid Run用フローセルを装置に設置したら必ず、レーン1-3,6-8の廃液チューブをMilliQ水に浸すこと。**



\*Assumes High Output post-run maintenance wash has already been performed (~2 hours 40 minutes)

illumina

2

## HCS Rapid Run: Mode 初期画面

- ▶ Hiseq2500のとき2つのパネル
  - 左がFlow Cell A、右がFlow Cell B
  - 各パネルは独立して操作可能
  - Hiseq1500のとき、パネルは1つ
- ▶ 各機能のボタンを押すことで各ステップがスタートする
  - Sequence →シーケンス実行
  - Wash →メンテナンスウォッシュ
  - fluidics check → 送液チェック
  - Mode Select →モード切り替え
- ▶ Sequencing
  - 装置が1日以上Idle状態のとき、Water ウォッシュの実施が必須となる



A Welcome Screen Menu Button  
B Interface Panel for Flow Cell A  
C Interface Panel for Flow Cell B

3

## HCS Rapid Run Run Configuration: Wash

- ▶ Wash
  - Water またはMaintenance が選択可能
  - Water : MilliQのみ 15min程度
  - Maintenance: MilliQ → 1N NaOH → MilliQ 40min程度
  - Maintenance washの前にガasketの交換
  - 1日以上Idle状態のときwater washの実施が必須。



4

# HCS Rapid Run Run Configuration : Wash

- ▶ Washの流れ
  - 試薬セット → Wash用フローセル設置 → 送液チェック → Wash スタート
- ▶ 注意点
  - Temperateの1.5mLチューブに、1mLのMilliQ水を入れるのを忘れないこと
  - 使用するWash用フローセルのIDの入力が必須。  
Rapid run FC ID 例) HxxxxADXX
  - 送液チェック時に、1-3,6-8の廃液チューブがMilliQ水に浸してあることを確認する。



5

# HCS Rapid Run Run Configuration : ランスタート

- ▶ シーケンススタート
  - Sequence → New Run
- ▶ ボリュームチェック画面
  - 廃液量を測定して、各レーンの送液状態をチェックするステップ
  - Noを選択することでスキップ可能。
  - 実施した場合の各レーンの期待値は9.5mL



6

## Hiseq Rapid Run Run Configuration : Storage 選択

### ▶ データ保存設定

- BaseSpaceの使用設定(有償)
- ネットワーク保存先設定
- 圧縮設定選択
  - BCLのZip →36%圧縮
  - BCLのZip+ QスコアのBinning → 56%圧縮
- Thumbnail画像保存設定
  - All Thumbnails保存
  - Tile Thumbnailsのみ保存



7

## Hiseq Rapid Run Run Configuration : FC ID set up

### ▶ FC ID情報入力

- FC ID : バーコードスキャナー使用もしくは手入力(入力必須)
- Flow Cell Type : FC IDを元に自動入力
- Experiment : 手入力(入力必須)
- User Name : ログオン名が自動入力されている。変更可(入力必須)



8

## Hiseq Rapid Run Run Configuration : Advanced 設定

- ▶ Confirm First base
  - 1<sup>st</sup> Base reportを確認するかどうか。チェックを入れると、1cycle後に一旦ランがストップする。
- ▶ Control Lane
  - Control Laneの指定をするかどうか。指定する場合はControl Laneの番号を指定
- ▶ Align to PhiX
  - ラン中に、リードをPhiXのFastaファイルにアライメントするかどうか。アライメントするレーンを指定。
- ▶ Keep Intensity Files
  - Intensity filesを保存するかどうか。保存する場合、Outputフォルダのサイズが巨大になるので通常はチェックを入れないほうが良い。

- ▶ レーンの画像をクリックするとスキヤンの有無が選択可能
  - Rapid Modeでの時間短縮はほとんどない



9

## Hiseq Rapid Run Run Configuration : Recipes

- ▶ 実施するランのcycle条件設定
  - Index Type
    - No Index: Indexなし
    - Single Index: Single Index
      - 7cycleのみ
      - 8cycleの場合は、Customを選択する
    - Dual Index: Dual Index
      - 8cycle +8 cycle
    - Custom Index
      - オリジナルのIndex cycleを記入
      - 8cycle single Indexの場合は、Index1に8、Index2に0を入力する
  - Flow Cell Format
    - Single read またはPaired Endの選択は必須。間違えないこと。
  - Cycles:
    - Read1とRead2のcycle数のみ手入力

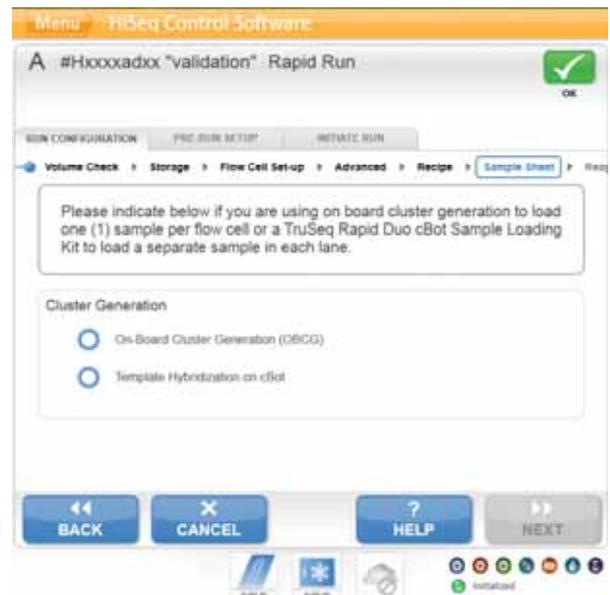
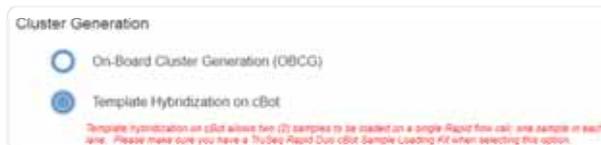


10

# Hiseq Rapid Run Run Configuration : Sample sheet

## Cluster Generation手法選択

- On Board Cluster Generation (OBCG)
  - Templateを装置にセットして、2レーンとも同じライブラリをシーケンスする設定
  - この場合、Primingは不要
- Template Hybridization on cBot
  - 専用試薬プレートを用いて、cBotでTemplateをハイブリ化する。各レーンに異なるサンプルをロードすることが可能
  - この場合、フローセル設置前に、使用済みフローセルを用いたPriming stepが追加される。



## Sample Sheet選択

- 前のステップでIndexありのシーケンスを選択した場合、SampleSheetの選択が可能
- 選択しなくてもNextの選択ができる

illumina®

11

# Hiseq Rapid Run Run Configuration : Reagents

## 試薬情報入力

- 使用する試薬のIDをスキャンする(入力必須)
- 使用する試薬の種類を選択
  - 試薬使用量のカウントダウンのため
- Prime SBS reagent
  - OBCGのとき、選択項目はない。
  - Template Hybridization on cBotを選択した場合、デフォルトで必須。



12

# Hiseq Rapid Run Run Configuration : Review

- ▶ 設定最終確認画面
  - 必要に応じてBACKで設定をやり直すことができる



13

# Hiseq Rapid Run Pre-Run Setup: Load Reagent

- ▶ 試薬の設置
  - OBCGとcBot使用とで、Templateのチューブの設置の有無の確認が異なる



14

# Hiseq Rapid Run Pre-Run Setup: Load Priming FC

cBot template hybのみ

## ▶ Primingの実施

- cBot template hybのみ、Primingが必須
- HCSの指示に従って、以下の操作を実施する。
  - 使用済みFCのID入力、
  - 使用済みフローセルの設置、
  - 液量チェック、
  - Priming (7-8min)



15

# Hiseq Rapid Run Initiate Run: Load Seq FC

## ▶ シーケンス用フローセルの設置

- Run Configuration : FC ID set upで入力したFCを装置に設置する。
- FC IDをスキャンして入力する
  - 最初の入力IDと同一である必要がある



illumina

16

## Hiseq Rapid Run Initiate Run: Fluidics Check

### ▶ 流路チェック

- 5番または6番のUSBを用いて設置したフローセルに送液し、フローセルの設置状態をチェックする。



illumina®

17

## Hiseq Rapid Run Initiate Run: Close Door

- ▶ HCSの指示に従い、ドアを閉じる
- ▶ Startボタンがアクティブになったら、ラン開始可能



18

# Hiseq Rapid Run 1st Base Report

重要: 値はあくまでもガイダンス。装置や、用いるサンプルの性情によって値は変わる

## FBR Guidelines\* (Rapid Run)

First Base Report (FBR) \ <run_folder&gt;\first_base_report< th=""><th>Expected value</th></run_folder&gt;\first_base_report<>	Expected value
Cluster density	400-600 K/mm2
C Intensity	>20000
A Intensity	>15000
G Intensity	>10000
T Intensity	>15000
Focus Score (Avg)	>55



\*Important: Values are only a guideline and each run should be assessed individually!

## FBR example

### First Base Report

120827\_D0003\_0438\_AH00GHADXX

### Top Surface

Metric	Lane 1	Lane 2
Cluster Density (k/mm2)	560.16	554.15
A Intensity	48517	47676
C Intensity	73616	72221.5
G Intensity	25786	26065.5
T Intensity	43358.5	43446.5
A Focus Score	82.3	82.19
C Focus Score	80.8	80.58
G Focus Score	82.94	83.11
T Focus Score	81.94	81.96

illumina

19

# Hiseq Rapid Run Initiate Run: Post Wash

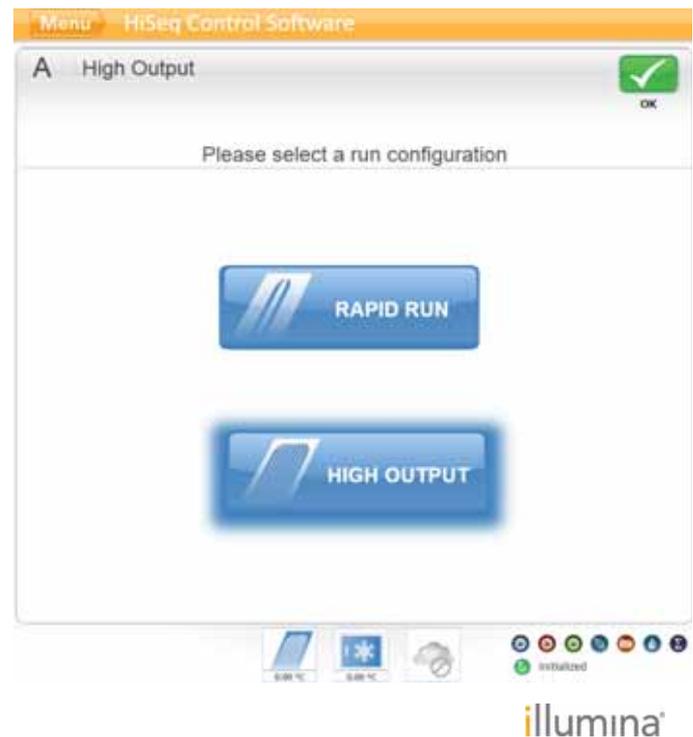
- ▶ ラン終了後、Post Wash (Water Wash) が必須
  - HCSが自動的に実施を促す
- ▶ HCSの指示に従い、装置にMilliQ水をセットして、Water Washを実施。
  - 各レーンの廃液量は19 mL
- ▶ その後、改めてMaintenance Washを実施したほうがよい

illumina

20

## HiSeq High Output Run 立ち上げ画面

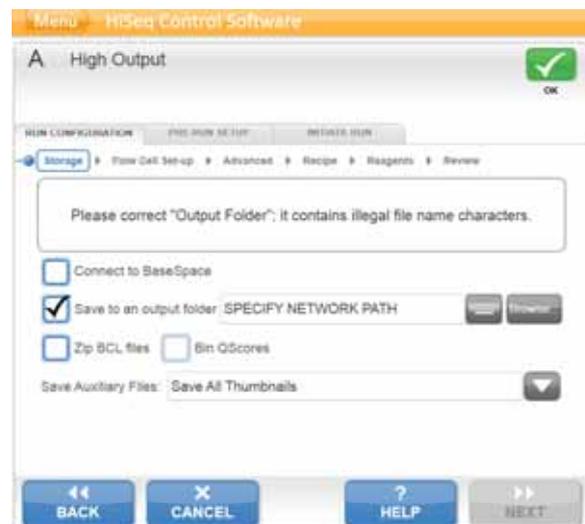
- ▶ 前回のシーケンスが High Output の場合は High Output がハイライトされている。
- ▶ 前回のランが Rapid Run の場合は、メンテナンスウォッシュが必要
  - Rapid Run と High Output のそれぞれのメンテナンスウォッシュが必須。
  - 4 時間かかる
  - 1-3,6-8の廃液チューブを廃液ボトルに入れるのを忘れないこと。



21

## HiSeq High Output Run Run Configuration : Storage

- ▶ Sequence → New Run で右の画面に移行
- ▶ データ保存設定
  - BaseSpaceの使用設定(有償)
  - ネットワーク保存先設定
  - 圧縮設定選択
    - BCLのZip →36%圧縮
    - BCLのZip+ Qスコアの Binning → 56%圧縮
  - Thumbnail画像保存設定
    - All thumbnails保存
    - Tile Thumbnailsのみ保存



22

## Hiseq High Output Run Run Configuration : Flow Cell Set up

### ▶ FC ID情報入力

- FC ID : バーコードスキャナー使用もしくは手入力 (入力必須)
- Flow Cell Type : FC IDを元に自動入力
- Experiment : 手入力(入力必須)
- User Name : ログオン名が自動入力されている。変更可(入力必須)

illumina

23

## Hiseq High Output Run Run Configuration : Advanced

### ▶ Confirm First base

- 1<sup>st</sup> Base reportを確認するかどうか。チェックを入れると、1cycle後に一旦ランがストップする。

### ▶ Control Lane

- Control Laneの指定をするかどうか。指定する場合はControl Laneの番号を指定

### ▶ Align to PhiX

- ラン中に、リードをPhiXのFastaファイルにアライメントするかどうか。アライメントするレーンを指定。

### ▶ Keep Intensity Files

- Intensity filesを保存するかどうか。保存する場合、Outputフォルダのサイズが巨大になるので通常はチェックを入れないほうが良い。

### ▶ レーンの画像をクリックするとスキャンの有無が選択可能

- ▶ レーン数を少なくすることで、ラン時間の短縮が可能

24

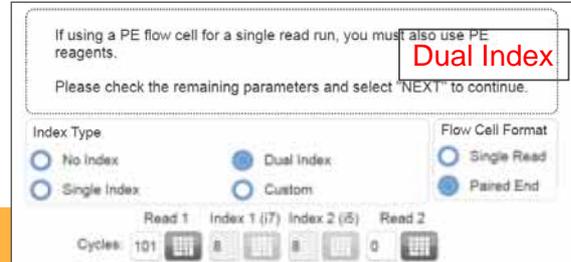
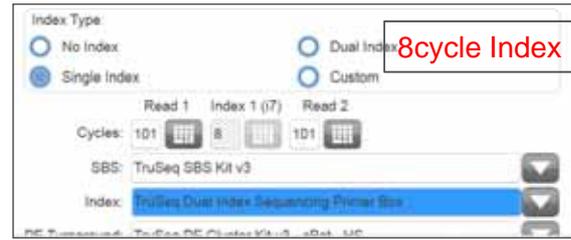
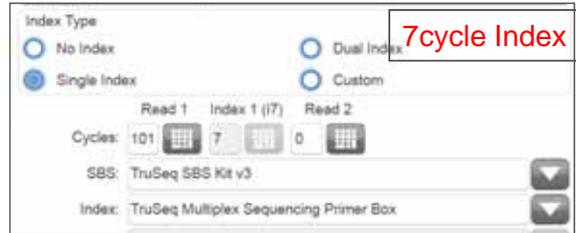
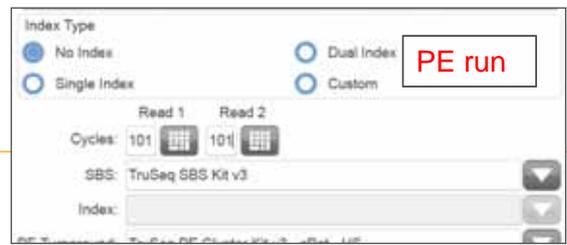
# Hiseq High Output Run Run Configuration : Recipe

## 実施したいランに応じてレシピの設定を行う

- PE かSRかは、Read2 に数字を入れるかどうかで選択される
- Single indexの7cycleか8cycleかは、Index試薬を変えることで選択
- Dual IndexとCustom Indexのみ、FC typeのマニュアル選択が必要



25



# Hiseq High Output Run Run Configuration : Sample Sheet

- ▶ Index Runの場合は、SampleSheet選択画面
  - 選択しなくてもNextは選べる。



26

# Hiseq High Output Run Run Configuration : Reagent

## 試薬IDの入力

- RGTで始まる番号をスキャンする
- Primeは通常チェックを入れたままにする。

illumina®

27

# Hiseq High Output Run Run Configuration : Review

## 設定最終確認画面

- 必要に応じてBACKで設定をやり直すことができる

illumina®

28

# Hiseq High Output Run Pre-Run Setup: Load Reagent

- ▶ 試薬の設置
  - PW1はMilliQ水でもよい



illumina®

29

# Hiseq High Output Run Pre-Run Setup: Load FC, Prime

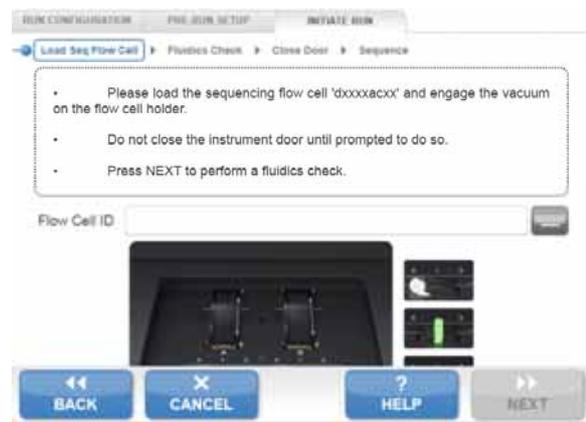
- ▶ 使用済みFCのIDを入力してNext
- ▶ 2番のMilliQで流量チェック
  - または5番、6番。使いすぎないこと
- ▶ Nextで下のPrime画面



30

## Hiseq High Output Run Initiation: Load FC

- ▶ シーケンス用フローセルIDの入力
  - 最初に入力したフローセルIDと一致する必要がある。
- ▶ FCの設置
  - バキュームが正しく働くと、緑に変わる



illumina®

31

## Hiseq High Output Run Initiation: Fluidics check

- ▶ 5番試薬で流量チェック
  - 必ず5番もしくは6番を用いる。
  - 使いすぎないこと



illumina®

32

## Hiseq High Output Run Initiate Run: Close Door

- ▶ HCSの指示に従い、ドアを閉じる
- ▶ Startボタンがアクティブになったら、ラン開始可能



33

## Hiseq High Output Run Post wash: Maintenance wash

- ▶ ラン終了後
  - ガasket交換およびメンテナンスウォッシュを実施するまで次のシーケンスは選択できない。



illumina®

34

## HiSeq 使用上の注意 (電源On/Off関連)

- ▶ 常に“DONOTEJECT” driveを確認する
  - HiSeqおよび制御PCの電源をOnする度に、“DONOTEJECT” driveが存在することを確認する。もしこのドライブが認識されていない場合は、HiSeqの電源Off→Onを認識されるまで繰り返す
  - Note: HiSeqの電源をOffした場合は、電源Onするまで、60秒以上待つ
- ▶ 電源Onの正式な順序
  - Switch on HiSeq PC -> Switch on HiSeq -> Check for “DONOTEJECT” drive -> Launch HiSeq Control Software (HCS)
- ▶ 電源Offの正式な順序
  - Switch off HCS -> Switch off HiSeq -> Switch off HiSeq PC
- ▶ ラン中にHiSeqの電源on/offは絶対に行わない。まれに、HCSをラン中にシャットダウンすることで、“DONOTEJECT” drive が消えることがある。この場合は、HiSeqのUSBを抜き差しすることで、“DONOTEJECT” drive が再表示される。