

令和 7 年 11 月 (第 3 版) **
令和 6 年 4 月 (第 2 版) *

届出番号 : 11B1X10017000063

機械器具 17 血液検査用器具
一般医療機器 遺伝子解析装置 (70192000)
遺伝子解析装置 DNBSEQ-G400

特定保守管理医療機器 / 設置管理医療機器

再使用禁止 [構成部品 (ハイスループット配列決定セット、OneStep DNB Make Reagent Kit)]**

【警告】

- ・試薬カートリッジセット及び廃液を扱う際は保護具（眼用保護具、手袋、実験室用コートなど）を着用し、突発的な暴露に対応できるようにする。[潜在的に危険な化学物質の吸入、経口摂取、皮膚接触、および眼接触を避けるため]
- ・自治体の規則に従って、使用済み試薬を化学廃棄物として取り扱い廃棄すること。[試薬カートリッジセットは、潜在的に危険な化学物質を含有するため] [使用される検体サンプル、サンプルと接触するすべての部品および消耗品はバイオハザード物質とみなされるため]

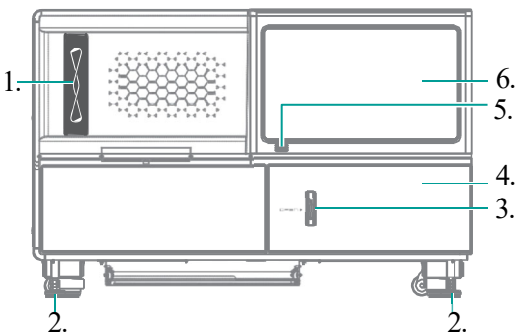
【禁忌・禁止】**

- ・構成部品 (ハイスループット配列決定セット、OneStep DNB Make Reagent Kit) は再使用しないこと。

【形状・構造及び原理等】**

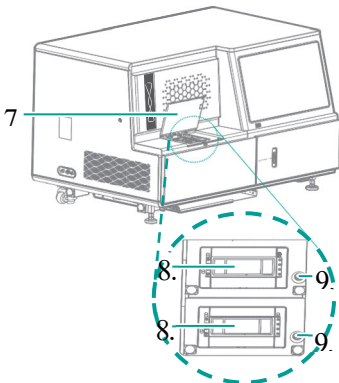
(形状・構造等)

本体



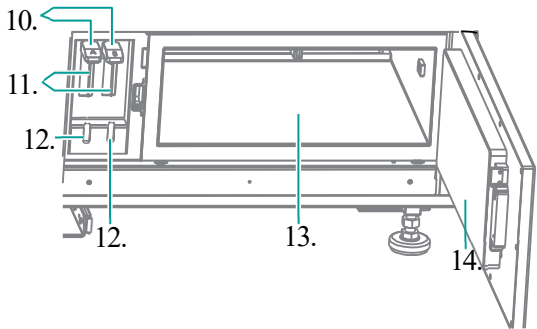
番号	名称
1.	ステータスインジケータ
2.	支持足
3.	試薬コンパートメントのラッチ
4.	試薬コンパートメント
5.	ブザー
6.	タッチスクリーンモニター

フローセルコンパートメント



番号	名称
7.	フローセルコンパートメントドア
8.	フローセルステージ
9.	フローセル接続ボタン

試薬コンパートメントの内部



番号	名称
10.	ベース
11.	試料針
12.	試料管ラック
13.	試薬容器
14.	試薬コンパートメントドア

本体付属品 (同梱)

電源コード、シーリングガスケット、クリーニングカートリッジ、洗浄用フローセル、マウス及びキーボード、QR コードスキャナ及びホルダ、MGIDL-200H、レベルセンサー付廃棄物容器、制御用ソフトウェア (なお、付属品は単品で製造販売することがある)

構成部品 (ハイスループット配列決定セット)

消耗品のため本体とは別に販売する。
配列決定サイクルにより下記から使用する配列決定セットを選択する。

- ① G400 SM FCL SE35
- ② G400 SM FCL SE50
- ③ G400 SM FCL SE100
- ④ G400 SM FCL PE50
- ⑤ G400 SM FCL PE100
- ⑥ G400 SM FCL PE150
- ⑦ G400 App-D FCL SE50
- ⑧ G400 App-D FCL SE100
- ⑨ G400 App-D FCL PE100
- ⑩ G400 App-D FCL PE150
- ⑪ G400 FCL SE35
- ⑫ G400 FCL SE50
- ⑬ G400 FCL SE100
- ⑭ G400 FCL PE100
- ⑮ G400 FCL PE150
- ⑯ G400 SM App-A DB FCS PE100
- ⑰ G400 SM App-A DB FCS PE150

⑮	G400 SM App-A FCS SE100
⑯	G400 SM DB FCS PE100
⑰	G400 SM DB FCS PE150
⑱	G400 SM DB FCS SE100
㉑	G400 SM FCS PE100
㉒	G400 SM FCS PE150
㉓	G400 SM FCS SE100

なお、各配列決定セットは以下の試薬から構成されている。
(詳細はハイスループット配列決定セットの取扱説明書を参照)

	コンポーネント
パッケージ	G400 Sequencing Flow Cell (配列決定フローセル)
	G400 Rapid Sequencing Flow Cell (迅速配列決定フローセル)
パッケージ ＝	Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)
	Cyclization Buffer (環化緩衝液)
	Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)
	App Make DNB Buffer (App DNB 緩衝作成液)
	App-A Make DNB Buffer (App-A DNB 緩衝作成液)
	Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)
	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)
	Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)
	Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)
	DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I)
	DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)
	Micro Tube (マイクロチューブ) 0.5mL (空)
	dNTPs Mix (dNTPs ミックス)
	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)
	Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス)
	Sequencing Enzyme Mix II (配列決定酵素ミックス II)
	Ligase (リガーゼ)
	MDA Reagent (MDA 試薬)
	Inactive MDA Reagent (非活性化 MDA 試薬)
	MDA Block Reagent (MDA ブロック試薬)
	MDA Block Component (MDA ブロックコンポーネント)
	MDA Enzyme Mix (MDA 酵素ミックス)
	MDA Enzyme Mix II (MDA 酵素ミックス II)
	Sequencing Reagent Cartridge (配列決定試薬カートリッジ)
	透明封止フィルム

構成品 (OneStep DNB Make Reagent Kit)

消耗品のため本体とは別に販売する。
指定されたアダプターを含む dsDNA ライブラリを DNB ライブラリに変換し、ハイスループット配列決定を行うためのものである。
以下の試薬から構成されている。
(詳細は OneStep DNB Make Reagent Kit の取扱説明書を参照)

コンポーネント
Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)
Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液) (OS-App-V4.0)
Conversion Enzyme (変換酵素)
Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液) (OS-V4.0)
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)
Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)

〈寸法・重量〉
寸法：1086 mm (L)×756 mm (W)×710 mm (H)
質量：193 kg

〈電気的定格〉

種類	値
定格電源電圧	100-240V AC
周波数	50/60 Hz
定格入力	1200VA
保護の形式による分類	クラス I 機器

〈原理〉
本品は、機器固有の試薬とフローセルイメージングハードウェア、およびデータ分析ソフトウェアを使用して、レポート分子の光学および電子信号を測定し、DNA または RNA 断片の配列情報をデコードする配列決定機器である。本品は、DNA ナノボールライブラリなどの特定の配列決定ライブラリに準備された DNA または RNA 配列を解明することを目的としている。

【使用目的又は効果】
本品は、試料から抽出した核酸分子の配列情報を分析する装置である。

- 【使用方法等】**
1. 設置時の注意
- 本体の設置・移設は、必ず販売元担当者が行う。
 - 本体は、設置温度 19℃～25℃、相対湿度（非結露）20～80% にて直射日光が当たらず、熱源や振動源から離れ、電氣的干渉の無い場所に設置すること。
 - 本体の上、背後、両側に適当な距離を確保できる水平な場所に据え付け、本体の足は完全に机の上に載せること。
 - 本体は無停電電源装置（UPS）と共に使用することをお勧めする。

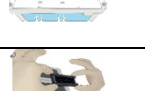
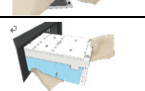
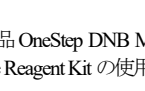
2. 使用方法
- 提供されていない必須の機器と消耗品
以下の機器及び消耗品は本品を使用する際に別途必須である。
 - ・Qubit® 3.0 蛍光計
 - ・Qubit® 4.0 蛍光計
 - ・ミニ遠心分離機
 - ・ボルテックスミキサー
 - ・PCR 装置
 - ・ピペット
 - ・超純水装置
 - ・2℃～8℃ 冷蔵庫
 - ・-25℃～-15℃ 冷凍庫
 - ・Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット)
 - ・PowerDust リムーバー
 - ・缶入りエアダスター
 - ・キムワイプ
 - ・滅菌ピペットチップ(箱)
 - ・200μL 広口ピペットチップ
 - ・Qubit dsDNA Assay Kit (Qubit dsDNA アッセイキット)
 - ・Qubit Assay Tubes (Qubit アッセイチューブ)
 - ・100% Tween-20
 - ・5M NaCl 溶液

- ・2M NaOH 溶液
- ・0.2mL PCR 8-チューブストリップ
- ・1.5mL Eppendorf
- ・2.0mL Eppendorf
- ・氷ラック

なお、推奨するメーカー等の情報はハイスループット配列決定セットの取扱説明書を参照ください。

(2) DNB の作成と試薬の準備

以下の手順は、手作業(マニュアル操作)による DNB 作成と準備の方法である。検体前処理装置を用いる場合は一部重複する手順があるため併用する検体前処理装置の操作方法も参照すること。

1.		DNB の作成。DNB 準備キットを使用します。
2.		DNB をロードします。サンプルチューブを MGIDL-200H またはシーケンサーに配置します。
3.		新しいフローセルを準備します。パッケージからフローセルを取り出し、フローセルが無傷であることを確認します。
4.		新しい試薬カートリッジを準備します。試薬カートリッジを検査して解凍し、必要な試薬をロードして混合します。
5.		フローセルをロードします。フローセルをシーケンサーのステージに配置します。
6.		試薬カートリッジをシーケンサーにロードします。
7.		指示に従って配列決定情報を入力し、実行を開始します。
8.		制御用ソフトウェアインターフェイスから配列決定の実行を監視します。
9.		配列決定が完了したら本体のメンテナンスを実行します。

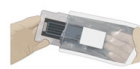
※構成品 OneStep DNB Make Reagent Kit を使用する場合は、OneStep DNB Make Reagent Kit の使用手順を先に実施してください。

＜構成品①～⑥を使用する場合＞

10.	ライブラリの準備 [挿入サイズの推奨事項] 本配列決定セットは、MGI Library Prep Kits (MGI ライブラリー準備キット) で準備されたライブラリと互換性があります。 挿入サイズに関するライブラリの推奨事項： SE50 の場合、インサートのサイズ分布は 160～170bp を中心とすることが望ましいです。PE100 の場合、インサートのサイズ分布は約 280bp を中心とすることが望ましいです。PE150 の場合、インサートのサイズ分布は約 400bp を中心とすることが望ましいです。 [ライブラリの要件] 各反応には 40fmol ssDNA ライブラリを推奨します。Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット) と Qubit® Fluorometer (Qubit® 蛍光計) を使用して ssDNA ライブラリの定量を実行します。また、ssDNA ライブラリの濃度は 2fmol/μL 以上です。それ以外の場合、必要な ssDNA ライブラリの容量は、次の式によって決定されます。 必要な容量(μL) = $N \times 330 \times 40 / (1000 \times 1000 \times C)$ N は、ライブラリ QC ゲルのピーク周辺のヌクレオチド数を表します。C は ssDNA ライブラリの濃度(ng/μL)を表します。 ライブラリキットの仕様に特別な要件がある場合は、キットの仕様要件が適用されます。
11.	DNB 作成のための試薬の準備 ライブラリ、Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)、Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)、Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を保管庫から取り出します。試薬を氷上で約 0.5 時間解凍します。解凍後、5 秒間ボルテックスミキサーを使用して試薬を混合し、短時間速

	心して氷上に置きます。																						
12.	DNB の作成 DNB はシーケンサーによって直接ロードできますが、4 つのレーンはすべて同じサンプルでなければなりません。4 つの異なるレーンにさまざまなサンプルをロードする必要がある場合は、MGIDL-200H 機器を使用することをお勧めします。(MGIDL-200H の使用方法は(12)参照)																						
13.	DNB 作成反応の後、100μL の DNB 作成反応液のうち 50μL を配列決定フローセルの各レーンにロードします。さまざまなローディングシステムに必要な DNB 作成反応数を下記表に示します。 <table><tr><th>フローセルのレーンの使用数</th><th>必要な DNB 作成反応数</th><th>ローディングシステム</th></tr><tr><td>4</td><td>2</td><td>シーケンサー</td></tr><tr><td>3</td><td>2</td><td>MGIDL-200H</td></tr><tr><td>1-2</td><td>1</td><td>MGIDL-200H</td></tr></table>	フローセルのレーンの使用数	必要な DNB 作成反応数	ローディングシステム	4	2	シーケンサー	3	2	MGIDL-200H	1-2	1	MGIDL-200H										
フローセルのレーンの使用数	必要な DNB 作成反応数	ローディングシステム																					
4	2	シーケンサー																					
3	2	MGIDL-200H																					
1-2	1	MGIDL-200H																					
14.	0.2mL PCR 8 チューブストリップまたは PCR チューブを手に取ります。下記表に従って Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 1 を準備します。 <table><tr><th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr><tr><td>ssDNA ライブラリ</td><td>V</td></tr><tr><td>Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)</td><td>20-V</td></tr><tr><td>Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液)</td><td>20</td></tr><tr><td>総容量</td><td>40</td></tr></table> V は(1)ライブラリの要件で決定された可変サンプル量を表します。ボルテックスでやさしく混合し、ミニ遠心分離機を使用して 5 秒間沈降させます。ミックスを PCR 装置に入れ、反応を開始します。PCR 装置の設定については、下記表で説明しています。 <table><tr><th>温度</th><th>時間</th></tr><tr><td>加熱蓋(105°C)</td><td>オン</td></tr><tr><td>95°C</td><td>1 分</td></tr><tr><td>65°C</td><td>1 分</td></tr><tr><td>40°C</td><td>1 分</td></tr><tr><td>4°C</td><td>ホールド</td></tr></table>	コンポーネント	容量(μL)	ssDNA ライブラリ	V	Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)	20-V	Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液)	20	総容量	40	温度	時間	加熱蓋(105°C)	オン	95°C	1 分	65°C	1 分	40°C	1 分	4°C	ホールド
コンポーネント	容量(μL)																						
ssDNA ライブラリ	V																						
Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)	20-V																						
Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液)	20																						
総容量	40																						
温度	時間																						
加熱蓋(105°C)	オン																						
95°C	1 分																						
65°C	1 分																						
40°C	1 分																						
4°C	ホールド																						
15.	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)を保管庫から取り出し、氷上に置きます。5 秒間軽く遠心し、氷上で保持します。 [注意] Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)を室温に置かず、内容物を加熱するような方法でチューブを保持しないでください。																						
16.	反応が 4°C で保持相に入った後、PCR 装置から PCR チューブを取り出します。5 秒間簡単に遠心分離し、チューブを氷上に置き、Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 2 を調製します。 <table><tr><th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr><tr><td>Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)</td><td>40</td></tr><tr><td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)</td><td>4</td></tr></table>	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4																
コンポーネント	容量(μL)																						
Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40																						
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4																						
17.	Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 2 を全て Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 1 に追加します。ボルテックスでやさしく混合し、ミニ遠心分離機を使用して 5 秒間遠心分離し、次の反応のために PCR 装置にチューブを入れます。条件を下記表に示します。 <table><tr><th>温度</th><th>時間</th></tr><tr><td>加熱蓋(35°C)</td><td>オン</td></tr><tr><td>30°C</td><td>25 分</td></tr><tr><td>4°C</td><td>ホールド</td></tr></table> [注意] 加熱蓋の温度を 35°C または 35°C に最も近い温度に設定することをお勧めします。	温度	時間	加熱蓋(35°C)	オン	30°C	25 分	4°C	ホールド														
温度	時間																						
加熱蓋(35°C)	オン																						
30°C	25 分																						
4°C	ホールド																						

18.	反応が 4°C でコールドホールドに入った直後に、20μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液) を加えます。5~8 回広口ピペッティングをしてやさしく混合します。チューブをボルテックスにかけたり、振ったりしないでください。DNB を 4°C で保存し、48 時間以内に配列決定を実行します。 [注意] 広口ピペッティングにより DNB をやさしく混合することが非常に重要です。チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。								
19.	DNB の作成が完了したら、Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット) と Qubit® Fluorometer (Qubit® 蛍光計) を使用して DNB を定量化します。配列決定の際、DNB 濃度が 8ng/μL を超える必要があります。濃度が 8ng/μL より低い場合、新しい DNB 調製を行います。 [注意] - DNB は粘性があるため、定量には 2μL を取ることをお勧めします。サンプル数が多い場合、蛍光消光による不正確な DNB 定量を避けるために、バッチで定量することをお勧めします。 - 濃度が 40ng/μL を超える場合、DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I) で DNB を 20ng/μL に希釈してロードする必要があります。								
20.	シーケンサー DNB ローディング 0.5mL の微量遠心管を取り、下記表に従って試薬を追加します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)</td><td>64</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))</td><td>2</td></tr> <tr> <td>DNB</td><td>200</td></tr> </tbody> </table>	コンポーネント	容量(μL)	DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	64	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))	2	DNB	200
コンポーネント	容量(μL)								
DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	64								
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))	2								
DNB	200								
21.	コンポーネントを組み合わせて DNB ローディングミックス 1 を作成し、5~8 回広口ピペッティングをしてやさしく混合します。チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。使用するまで混合物を 4°C で置きます。 [注意] 配列決定実行の前に、新しい DNB ローディングミックスを準備します。								
22.	MGIDL-200H DNB ローディング 新しい PCR 8 チューブストリップを取り出し、下記表に従って試薬を追加します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)</td><td>16</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))</td><td>0.5</td></tr> <tr> <td>DNB</td><td>50</td></tr> </tbody> </table> コンポーネントを組み合わせて DNB ローディングミックス 2 を作成し、5~8 回広口ピペッティングをしてやさしく混合します。チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。	コンポーネント	容量(μL)	DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	16	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))	0.5	DNB	50
コンポーネント	容量(μL)								
DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	16								
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液(LC))	0.5								
DNB	50								
23.	 DNB ローディングミックス 2 を作成した後、MGIDL-200H のラベルの付いた位置にチューブを置きます。								
24.	「フローセルのロード」に従って、フローセルに DNB をロードします。 [注意] DNB をロードする前に、MGIDL-200H 取扱説明書の説明に従って洗浄を実行します。								
25.	DNB をロードした後、フローセルを取り外し、室温で 30 分置き、すぐに使用するためにシーケンサーステージに置きます。 [注意] DNB をロードするときにフローセルを動かさないでください。フローセルは、室温に置いた後、すぐに使用する必要があります。								
26.	配列決定カートリッジの準備 -20°C から Sequencing Reagent Cartridge (配列決定試薬カートリッ								

34.		透明なシーリングフィルムでローディングウェルを密封します。試料針の詰まりを避けるため、ウェルの中心を覆わないでください。
35.		カートリッジをテーブルの上に水平に置き、両手でカートリッジの両側を持ちます。時計回りに10〜20回、次に反時計回りに10〜20回動かします。渦が見えるようにして、試薬が完全に混合されていることを確認してください。
36.		#15 ウェル：次の手順は、PE カートリッジ専用です。 500μL の MDA Enzyme Mix (MDA 酵素ミックス) を 1mL ピペットで MDA Reagent (MDA 試薬) チューブに加えます。5 秒間ボルテックスをかけて、完全に混合してから、混合物を #15 ウェルに加えます。混合物を追加するとき、チューブの底に気泡がないことを確認してください。 [注意] MDA Enzyme Mix (MDA 酵素ミックス) を使用する場合、酵素活性への影響を防ぐためにチューブの壁に触れないでください。
37.		フローセルの準備 保管庫から配列決定フローセルを取り出します。
38.		外側のパッケージを開封します。
39.		内側のパッケージからフローセルを取り出し、フローセルが無傷であることを確認します。

＜構成成分⑦～⑮を使用する場合＞

10.	サンプルの要件 一般的な一本鎖環状 DNA ライブラリについて ・構成成分⑦～⑩ (G400 App-D FCL SE50 / G400 App-D FCL SE100 / G400 App-D FCL PE100 / G400 App-D FCL PE150) 配列の場合、ssDNA ライブラリの量は 60fmol 以上、かつライブラリ濃度は 3fmol/μL 以上である必要があります。 ・構成成分⑪～⑮ (G400 FCL SE35 / G400 FCL SE50 / G400 FCL SE100 / G400 FCL PE100 / G400 FCL PE150) 配列の場合、ssDNA ライブラリの量は 40fmol 以上、かつライブラリ濃度は 2fmol/μL 以上である必要があります。
11.	ライブラリの要件 ・環化、消化及び精製工程を実施して得られた ssDNA ライブラリの場合、以下の手順を実施します。 1) Qubit ssDNA Assay Kit と Qubit Fluorometer を使用して ssDNA ライブラリの定量 (ng/μL) を実施します。 以下の式を使用して、ssDNA ライブラリの濃度を ng/μL から fmol/μL に変換します。 $C \text{ (fmol/μL)} = 3030 \times C \text{ (ng/μL)} / N$ N は、アダプターを含む平均ライブラリ長として決定されたヌクレオチド数です。この値は断片サイズ解析により決定されます。通常、断片サイズ解析はライブラリ調製時に実施されます。 2) 各 Make DNB 反応の体積は 100μL です。各 Make DNB 反応に必要なライブラリ投入量は、以下の式で計算します。 各 Make DNB 反応の体積は 100μL です。 各 Make DNB 反応に必要なライブラリ投入量は以下の通り計算されます。 ・構成成分⑦～⑩ (G400 App-D FCL SE50 / G400 App-D FCL SE100 / G400 App-D FCL PE100 / G400 App-D FCL PE150) の配列：V (μL) = 60fmol / C (fmol/μL) ・構成成分⑪～⑮ (G400 FCL SE35 / G400 FCL SE50 / G400 FCL SE100 / G400 FCL PE100 / G400 FCL PE150) の配列：V (μL) = 40fmol / C (fmol/μL) ※ssDNA ライブラリを、消化及び精製工程を行わずに環化工程のみを実施して調製した場合、各 Make DNB 反応の反応液量は 100 μL であり、各 Make DNB 反応に必要なライブラリ投入量は 20μL です。(V (μL) = 20 μL)
12.	DNB の作成 [注意] ・DNB の転送または混合には、広口型のピペットチップを使用し

	てください。 ・他の試薬を操作する際は、実際の状況に応じて適切なピペットチップを使用してください。 ・配列決定実行には、2 つの DNB 作成反応が必要です。																														
13.	DNB 作成用の試薬の準備 以下の手順を実施します。 ・構成成分⑦～⑩の場合 1) ライブラリを氷上で保管し、使用時まで冷やしておきます。 2) Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、App Make DNB Buffer (App DNB 緩衝作成液) および Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液) を保管庫から取り出し、室温で解凍します。 3) Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液) を保管庫から取り出し、氷上で約 30 分間解凍します。 4) 解凍後、ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、軽く遠心分離し、使用まで氷上に置きます。																														
14.	・構成成分⑪～⑮の場合 1) ライブラリを氷上で保管し、使用時まで冷やしておきます。 2) Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)、Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、および Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液) を保管庫から取り出し、室温で解凍します。 3) Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液) を保管庫から取り出し、氷上で約 30 分間解凍します。 4) 解凍後、ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、軽く遠心分離し、使用まで氷上に置きます。																														
15.	構成成分⑦～⑩用の DNB の作成 以下の手順に従って操作します。 1) 0.2mL PCR 8 チューブストリップまたは PCR チューブを手に取ります。下記表に従って氷上で Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 1 を準備します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ssDNA ライブラリ</td><td>V</td></tr> <tr> <td>Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)</td><td>20-V</td></tr> <tr> <td>App Make DNB Buffer (App DNB 緩衝作成液)</td><td>20</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>40</td></tr> </tbody> </table> V は [ライブラリの要件] で決定された可変サンプル量を表します。 2) ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、完全に混合します。短時間遠心分離し、使用時まで氷上に置きます。 3) ミックスを PCR 装置に入れ、反応を開始します。PCR 装置の設定は、以下の表に示されています。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>加熱蓋 (105°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>95°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>65°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>40°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </tbody> </table> 4) Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC) を保管庫から取り出し、氷上に置きます。5 秒間遠心分離し、氷上で保持します。 [注意] ・Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC) を室温に置かず、チューブを長時間保持しないようにしてください。 5) 温度が 4°C に達したら、PCR 装置から PCR チューブを取り出します。5 秒間簡単に遠心し、チューブを氷上に置きます。 6) 以下の表に従って、Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 2 を調製します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)</td><td>40</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)</td><td>4</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>44</td></tr> </tbody> </table> 7) ミックスをボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、遠心分離する。 8) Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 2 の全量を Make DNB (DNB 作成) 反応ミックス 1 に追加します。ボルテックスで 5 秒間攪拌する。	コンポーネント	容量(μL)	ssDNA ライブラリ	V	Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	20-V	App Make DNB Buffer (App DNB 緩衝作成液)	20	総容量	40	温度	時間	加熱蓋 (105°C)	オン	95°C	1 分	65°C	1 分	40°C	1 分	4°C	ホールド	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)	4	総容量	44
コンポーネント	容量(μL)																														
ssDNA ライブラリ	V																														
Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	20-V																														
App Make DNB Buffer (App DNB 緩衝作成液)	20																														
総容量	40																														
温度	時間																														
加熱蓋 (105°C)	オン																														
95°C	1 分																														
65°C	1 分																														
40°C	1 分																														
4°C	ホールド																														
コンポーネント	容量(μL)																														
Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)	40																														
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)	4																														
総容量	44																														

16.	9) PCR 装置にチューブを入れ、次の反応を開始します。条件は下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋(35°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>30°C</td><td>25 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table> 10) 温度が4°Cに達した直後に、20μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を加えます。 11) 広口ピペットチップを使用し、5〜8 回軽くピペッティングして混合します。 〔注意〕 • DNB は、広口ピペットチップを使用してやさしく混合することが非常に重要です。 • チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。 • DNB は4°Cで保存し、48 時間以内に使用してください。 12) DNB を定量化します。 手順 10) で得られた製品から 2μL を採取します。Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット)と Qubit® Fluorometer (Qubit® 蛍光計)を使用して DNB を定量化します。 〔注意〕シーケンスには最低限の DNB 濃度 8 ng/μL が必要です。配列決定の際、DNB 濃度が 8ng/μL を超える必要があります。濃度が 8ng/μL 未満の場合、下記ご確認ください。 • DNB 調製試薬の有効期限が切れていないか。 • ライブラリが要件を満たしているか。 • 新しい DNB を作成し、48 時間内に使用すること。 13) 濃度が 40ng/μL を超える場合、DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I)で DNB を 20ng/μL に希釈してロードする必要があります。 〔注意〕希釈が必要な場合、使用直前に希釈してください。	温度	時間	加熱蓋(35°C)	オン	30°C	25 分	4°C	ホールド																						
温度	時間																														
加熱蓋(35°C)	オン																														
30°C	25 分																														
4°C	ホールド																														
17.	構成部品⑩〜⑮用の DNB の作成 以下の手順に従って操作します。 1) 0.2mL PCR 8 チューブストリップまたは PCR チューブを手に取ります。下記表に従って氷上で Make DNB (DNB 作成)反応ミックス 1 を準備します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>ssDNA ライブラリ</td><td>V</td></tr> <tr> <td>Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)</td><td>20-V</td></tr> <tr> <td>Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)</td><td>20</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>40</td></tr> </table> V は、ライブラリの要件で決定された可変サンプル量を表します。 2) ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、完全に混合します。短時間遠心分離し、使用時まで氷上に置きます。 3) ミックスを PCR 装置に入れ、反応を開始します。PCR 装置の設定は、以下の表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋(105°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>95°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>65°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>40°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table> 4) Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)を保管庫から取り出し、氷上に置きます。5 秒間遠心分離し、氷上で保持します。 〔注意〕 • Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)を室温に置かず、チューブを長時間保持しないようにしてください。 5) 温度が4°Cに達したら、PCR 装置から PCR チューブを取り出します。5 秒間簡単に遠心し、チューブを氷上に置きます。 6) 以下の表に従って、Make DNB (DNB 作成)反応ミックス 2 を調製します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)</td><td>40</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)</td><td>4</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>44</td></tr> </table> 7) ミックスをボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、遠心分離す	コンポーネント	容量(μL)	ssDNA ライブラリ	V	Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	20-V	Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)	20	総容量	40	温度	時間	加熱蓋(105°C)	オン	95°C	1 分	65°C	1 分	40°C	1 分	4°C	ホールド	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4	総容量	44
コンポーネント	容量(μL)																														
ssDNA ライブラリ	V																														
Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	20-V																														
Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)	20																														
総容量	40																														
温度	時間																														
加熱蓋(105°C)	オン																														
95°C	1 分																														
65°C	1 分																														
40°C	1 分																														
4°C	ホールド																														
コンポーネント	容量(μL)																														
Make DNB High-efficiency Enzyme Mix I (DNB 高効率酵素ミックス I 作成液)	40																														
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4																														
総容量	44																														

	る。 8) Make DNB (DNB 作成)反応ミックス 2 の全量を Make DNB (DNB 作成)反応ミックス 1 に追加します。ボルテックスで 5 秒間攪拌する。 9) PCR 装置にチューブを入れ、次の反応を開始します。条件は下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋(35°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>30°C</td><td>25 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table>	温度	時間	加熱蓋(35°C)	オン	30°C	25 分	4°C	ホールド
温度	時間								
加熱蓋(35°C)	オン								
30°C	25 分								
4°C	ホールド								
18.	10) 温度が4°Cに達した直後に、20μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を加えます。 11) 広口ピペットチップを使用し、5〜8 回軽くピペッティングして混合します。 〔注意〕 • DNB は、広口ピペットチップを使用してやさしく混合することが非常に重要です。 • チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。 • DNB は4°Cで保存し、48 時間以内に使用してください。 12) DNB を定量化します。 手順 10) で得られた製品から 2μL を採取します。Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット)と Qubit® Fluorometer (Qubit® 蛍光計)を使用して DNB を定量化します。 〔注意〕シーケンスには最低限の DNB 濃度 8 ng/μL が必要です。配列決定の際、DNB 濃度が 8ng/μL を超える必要があります。濃度が 8ng/μL 未満の場合、下記ご確認ください。 • DNB 調製試薬の有効期限が切れていないか。 • ライブラリが要件を満たしているか。 • 新しい DNB を作成し、48 時間内に使用すること。 13) 濃度が 40ng/μL を超える場合、DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I)で DNB を 20ng/μL に希釈してロードする必要があります。 〔注意〕希釈が必要な場合、使用直前に希釈してください。								
19.	フローセルの準備 以下の手順に従ってください。 1) 配列決定キットからフローセルを取り出します。 〔注意〕この時点では外側のプラスチックパッケージを開けないでください。 2) フローセルを室温で 0.5 時間から 24 時間放置します。 3) 使用する直前に外側のプラスチックパッケージを剥がします。 4) フローセルを内側のパッケージから取り出し、破損がないか確認します。 5) 伍入りエアダスターを使用し、フローセルの背面を清掃します。								
20.	配列決定カートリッジの準備 以下の手順に従ってください。 1) Sequencing Reagent Cartridge (配列決定試薬カートリッジ)をパッケージから取り出し、室温の水浴で完全に解凍するまで解凍します (または 2°C〜8°Cの冷蔵庫で 1〜2 日前から解凍)。使用まで 2°C〜8°Cの冷蔵庫で保管します。 2) 使用前にカートリッジを 3 回反転させて混合します。カートリッジを上下に 20 回激しく振った後、左右に 20 回振ります。試薬が完全に混合していることを確認します。 3) カートリッジカバーと周囲の湿気をキムワイブのティッシュで拭き取ってください。 4) dNTPs Mix (dNTPs ミックス) と dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)をパッケージから取り出し室温で解凍します。解凍後、6 回反転させてすぐに氷の上に置き、使用時まで保管します。 5) PE 配列決定の場合 ①MDA Block Reagent (MDA ブロック試薬)をパッケージから取り出し、室温で解凍し、使用まで保管します。 ②MDA Block Component (MDA ブロックコンポーネント)をパッケージから取り出し、室温 20°Cから 30°Cで解凍し、使用まで保管します。解凍後、6 回反転させてください。 〔注意〕MDA Block Component (MDA ブロックコンポーネント)を 20°C未満の温度で保管せず、再凍結を避けてください。 ③パッケージから Inactive MDA Reagent (非活性化 MDA 試薬)を取り出し、使用まで氷上に置きます。								

21.	6) パッケージから Sequencing Enzyme Mix II (配列決定酵素ミックス II)を取り出し使用前に4℃で保存してください。 7) #1 ウェルおよび#2 ウェルの真ん中のシールを 1mL の無菌チップを使用して直径約 2cm の穴を開けてください。		
22.	8) 適切な容量範囲のピペットを取り、下表に従って試薬を#1 ウェルに追加します。		
	配列決定キット	dNTPs Mix (dNTPs ミックス)ローディング容量(mL)	Sequencing Enzyme Mix II (配列決定酵素ミックス II) ローディング容量(mL)
	G400 FCL SE35	0.400	0.750
	G400 FCL SE50	0.400	0.750
	G400 FCL SE100	0.550	1.100
	G400 FCL PE100	0.900	1.850
	G400 FCL PE150	1.250	2.500
	G400 App-D FCL SE50	0.400	0.750
	G400 App-D FCL SE100	0.550	1.100
	G400 App-D FCL PE100	0.900	1.850
	G400 App-D FCL PE150	1.250	2.500
23.	9) 適切な容量範囲のピペットを取り、下表に従って試薬を#2 ウェルに追加します。		
	配列決定キット	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)	Sequencing Enzyme Mix II (配列決定酵素ミックス II) ローディング容量(mL)
	G400 FCL SE35	0.600	0.350
	G400 FCL SE50	0.600	0.350
	G400 FCL SE100	0.800	0.500
	G400 FCL PE100	1.200	0.750
	G400 FCL PE150	1.700	1.050
	G400 App-D FCL SE50	0.600	0.350
	G400 App-D FCL SE100	0.800	0.500
	G400 App-D FCL PE100	1.200	0.750
	G400 App-D FCL PE150	1.700	1.050
24.	10) ローディング#1 ウェルおよび#2 ウェルを透明なシーリングフィルムで密封します。試薬がカートリッジから漏れ出さないように、フィルムを指でウェルの周囲に押さえ、ウェルがしっかり密封されていること、またフィルムとカートリッジ表面の間に気泡が存在しないことを確認します。 11) カートリッジを水平に持ち上げ、両側を両手でしっかり握ります。カートリッジを時計回りに 20 回激しく振った後、反時計回りに 20 回激しく振ります。試薬が完全に混合していることを確認します。 12) 混合が完了した後、ロードウェルからフィルムを慎重に取り除きます。 [注意] ・使用済みのシールフィルムは再使用しないでください。 ・#1 ウェルおよび#2 ウェルの周囲の表面が清潔であることを確認し、交差汚染を防止してください。 13) カートリッジを作業台の上に軽く叩き、試薬内の気泡を減少させます。 [注意] G400 FCL SE35/G400 FCL SE50/G400 FCL SE100 配列決定試薬カートリッジが使用準備完了です。		
25.	14) 以下の手順に従って、G400 FCL PE100/G400 FCL PE150/G400 App-D FCL PE100/G400 App-D FCL PE150 の配列を実施します。 ①1mL の無菌ピペットチップを使用して、#13 ウェルおよび#15 ウェルのシールを破ります。 ②1mL のピペットを使用し、MDA ブロック成分を MDA ブロック試薬チューブに 300 μL 加えます。チューブを 4~6 回反転させて、試薬を十分に混合します。 ③ミックスをウェル No.13 に加えます。混合液を加える際、気泡		

	が存在しないことを確認します。 ④1mLのピペットを使用し、Inactive MDA Reagent (非活性化MDA 試薬)チューブにMDA Enzyme Mix II (MDA 酵素ミックス II)を500μL加え、チューブを4~6回反転させて試薬を十分に混合します。 [注意] MDA Enzyme Mix II (MDA 酵素ミックス II)を使用する際は、チューブの壁に触れないでください。手の熱が酵素の活性に影響する可能性があります。 ⑤ミックスを#15 ウェルに追加します。ミックスを加える際は気泡が入らないように注意してください。 [注意] ・ミックスを移す際は、試薬チューブからこぼれないよう、慎重に操作してください。 ・G400 FCL PE100/G400 FCL PE150/G400 App-D FCL PE100/G400 App-D FCL PE150 配列決定試薬カートリッジが使用準備完了です。										
26.	DNB ローディング用試薬の準備 以下の手順を行ってください。 1) DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)を保管庫から取り出し、氷上で約30分間解凍します。 2) 解凍後、ボルテックスミキサーで5秒間しっかり混合します。軽く遠心分離し、使用するまで氷上に置きます。 [注意] DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II) に結晶が析出している場合は、使用前にボルテックスミキサーで1~2分間しっかり混合し、析出物を再溶解させてください。 3) シーケンス用パッケージから Micro Tube (マイクロチューブ) 0.5mL (空)を取り出し、以下の試薬を追加します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)</td><td>64</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)</td><td>2</td></tr> <tr> <td>DNBs</td><td>200</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>266</td></tr> </tbody> </table> 4) 広口ピペットチップを用いて、5~8回ピペッティングし、やさしく混合してください。 [注意] ・チューブを遠心、ボルテックス、または振らないでください。 ・配列決定実行の前に、新しい DNB ローディングミックスを調製してください。	コンポーネント	容量(μL)	DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	64	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	2	DNBs	200	総容量	266
コンポーネント	容量(μL)										
DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II)	64										
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	2										
DNBs	200										
総容量	266										

＜構成品⑩～⑫を使用する場合＞

10.	サンプルの要件 ・一般的なデュアルバーコード単一鎖環状DNAライブラリの場合：単一鎖DNAライブラリの量は40fmol以上、ライブラリ容量は20μL以上である必要があります。 ・App-A 単一鎖環状DNAライブラリの場合：ssDNAライブラリの量は60fmol以上、ライブラリ容量は20μL以上である必要があります。
11.	ライブラリの要件 以下の手順を実施します。 1) Qubit ssDNA Assay Kit と Qubit Fluorometer を使用して、ssDNAライブラリの定量 (ng/μL) を実施します。ssDNAライブラリの投入量は、定量結果に基づいて決定されます。 2) ライブラリ入力体積を計算します。 ・一般的なssDNAライブラリの場合、各 Make DNB 反応の体積は100μLであり、各 Make DNB 反応に必要なライブラリ投入量は以下の式で計算されます。 $V(\mu\text{L}) = N \times 330 \text{ g/mol} \times 40 \text{ fmol} \div (1000 \times 1000 \times C)$ ・App-A ssDNAライブラリの場合、各 Make DNB 反応の体積は100μLであり、各 Make DNB 反応に必要なライブラリ投入量は以下の通り計算されます。 $V(\mu\text{L}) = N \times 330 \text{ g/mol} \times 60 \text{ fmol} \div (1000 \times 1000 \times C)$ N はヌクレオチド数 (アダプターを含むライブラリ全体の長さ) を表します。C はssDNAライブラリの濃度 (ng/μL) を表します。

12.	DNB 作成用の試薬の準備 以下の手順を実施します。 1) Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液) / App-A Make DNB Buffer (APP-A DNB 緩衝作成液)、Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)、Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)、Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)をパッケージ II から取り出し、氷の入った容器に配置します。 2) 解凍後、ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、軽く遠心分離し、使用時に氷上に置きます。 〔注意〕 Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)を室温に置かず、チューブを長時間保持しないようにしてください。												
13.	DNB の作成 以下の手順に従います。 1) 0.2mL PCR 8 チューブストリップに以下の表に示されている試薬を追加します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>ssDNA ライブラリ</td><td>V</td></tr> <tr> <td>Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)</td><td>20-V</td></tr> <tr> <td>Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液) / App-A Make DNB Buffer (App-A DNB 緩衝作成液)</td><td>20</td></tr> </table> 〔注意〕 - 一般的な ssDNA ライブラリには、Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)を使用してください。 - App-A ssDNA ライブラリの場合、App-A Make DNB Buffer (App-A DNB 緩衝作成液)を使用してください。	コンポーネント	容量(μL)	ssDNA ライブラリ	V	Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)	20-V	Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液) / App-A Make DNB Buffer (App-A DNB 緩衝作成液)	20				
コンポーネント	容量(μL)												
ssDNA ライブラリ	V												
Low TE Buffer(低 TE 緩衝液)	20-V												
Make DNB Buffer(DNB 緩衝作成液) / App-A Make DNB Buffer (App-A DNB 緩衝作成液)	20												
14.	2) ボルテックスで十分に混合し、5 秒間遠心分離します。 3) ミックスを PCR 装置に入れ、反応を開始します。PCR 装置の設定は、下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋(105°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>95°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>65°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>40°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table>	温度	時間	加熱蓋(105°C)	オン	95°C	1 分	65°C	1 分	40°C	1 分	4°C	ホールド
温度	時間												
加熱蓋(105°C)	オン												
95°C	1 分												
65°C	1 分												
40°C	1 分												
4°C	ホールド												
15.	4) 反応が 4°C で保持相に入った後、PCR 装置から PCR チューブを取り出します。 5) 5 秒間簡単に遠心し、チューブを氷上に置きます。												
16.	6) 以下の表に従って、試薬を追加します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)</td><td>40</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)</td><td>4</td></tr> </table>	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4						
コンポーネント	容量(μL)												
Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40												
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液)(LC)	4												
17.	7) ミックスをボルテックスミキサーで軽く混合し、ミニ遠心分離機で 5 秒間遠心分離する。 8) PCR 装置にチューブを入れ、次の反応を開始します。条件は下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋(35°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>30°C</td><td>25 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table>	温度	時間	加熱蓋(35°C)	オン	30°C	25 分	4°C	ホールド				
温度	時間												
加熱蓋(35°C)	オン												
30°C	25 分												
4°C	ホールド												
18.	9) 反応が 4°C で保持相に入った直後に、20 μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を加えます。広口ピペットチップを使用し、5~8 回軽く混合します。 〔注意〕 - DNB は、広口ピペットチップを使用してやさしく混合することが非常に重要です。 - チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。 - DNB は 4°C で保存し、48 時間以内に使用してください。												
19.	10) DNB を定量化します。 手順 6) で得られた製品から 2μL を採取します。Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット)と Qubit® Fluorometer (Qubit® 蛍光計)を使用して DNB を定量化します。												

	〔注意〕 シーケンスには最低限の DNB 濃度 8 ng/μL が必要です。配列決定の際、DNB 濃度が 8ng/μL を超える必要があります。濃度が 8ng/μL 未満の場合、新しい DNB を作成し、48 時間内に使用すること。														
20.	11) 濃度が 40ng/μL を超える場合、DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I)で DNB を 20ng/μL に希釈してロードする必要があります。 〔注意〕 希釈が必要な場合、使用直前に希釈してください。														
21.	DNB ローディング用試薬の準備 シーケンサーまたは DL-200H を使用して DNB をロードする際は、以下の手順に従ってください。 1) 定量した DNBs 100μL と DNB Load Buffer II (DNB ロード緩衝液 II) 32μL を新しい Micro Tube (マイクロチューブ) 0.5mL (空)に移す。 2) マイクロチューブに Make DNB Enzyme Mix II (LC)を 1μL 加えます。 3) 広口チップを使用して、5~8 回ピペッティングで軽く混合します。 〔注意〕 - チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。 - 配列決定実行の前に、新しい DNB ロードミックスを準備してください。														
22.	配列決定カートリッジの準備 以下の手順に従ってください。 1) Sequencing Reagent Cartridge (配列決定試薬カートリッジ)、dNTPs Mix (dNTPs ミックス)および dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II) をパッケージ II から取り出し、室温で解凍します。 2) 試薬が完全に解凍した直後に、使用まで 4°C の冷蔵庫で保管します。 3) Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス)を取り出し、使用まで 4°C に置きます。 4) 1mL の滅菌チップを使用し、#1 および #2 ウェルの中央のシールを直径約 2cm の孔を開けます。														
23.	5) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って #1 ウェルに試薬を追加します。 <table border="1"> <tr> <th>配列決定キット</th><th>dNTPs Mix (dNTPs ミックス)ローディング容量(mL)</th></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS SE100</td><td>0.800</td></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS PE100</td><td>1.400</td></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS PE150</td><td>1.900</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A FCS SE100</td><td>0.800</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A DB FCS PE100</td><td>1.400</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A DB FCS PE150</td><td>1.900</td></tr> </table>	配列決定キット	dNTPs Mix (dNTPs ミックス)ローディング容量(mL)	G400 SM DB FCS SE100	0.800	G400 SM DB FCS PE100	1.400	G400 SM DB FCS PE150	1.900	G400 SM App-A FCS SE100	0.800	G400 SM App-A DB FCS PE100	1.400	G400 SM App-A DB FCS PE150	1.900
配列決定キット	dNTPs Mix (dNTPs ミックス)ローディング容量(mL)														
G400 SM DB FCS SE100	0.800														
G400 SM DB FCS PE100	1.400														
G400 SM DB FCS PE150	1.900														
G400 SM App-A FCS SE100	0.800														
G400 SM App-A DB FCS PE100	1.400														
G400 SM App-A DB FCS PE150	1.900														
24.	6) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って試薬を #2 ウェルに追加します。 <table border="1"> <tr> <th>配列決定キット</th><th>dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)</th></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS SE100</td><td>1.600</td></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS PE100</td><td>2.800</td></tr> <tr> <td>G400 SM DB FCS PE150</td><td>3.800</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A FCS SE100</td><td>1.600</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A DB FCS PE100</td><td>2.800</td></tr> <tr> <td>G400 SM App-A DB FCS PE150</td><td>3.800</td></tr> </table>	配列決定キット	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)	G400 SM DB FCS SE100	1.600	G400 SM DB FCS PE100	2.800	G400 SM DB FCS PE150	3.800	G400 SM App-A FCS SE100	1.600	G400 SM App-A DB FCS PE100	2.800	G400 SM App-A DB FCS PE150	3.800
配列決定キット	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)														
G400 SM DB FCS SE100	1.600														
G400 SM DB FCS PE100	2.800														
G400 SM DB FCS PE150	3.800														
G400 SM App-A FCS SE100	1.600														
G400 SM App-A DB FCS PE100	2.800														
G400 SM App-A DB FCS PE150	3.800														

25.	7) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って試薬を #1 ウェルおよび #2 ウェルに追加します。																							
	<table><tr><th rowspan="2">配列決定キット</th><th colspan="2">Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)</th></tr><tr><th>#1 ウェル</th><th>#2 ウェル</th></tr><tr><td>G400 SM DB FCS SE100</td><td>0.800</td><td>0.800</td></tr><tr><td>G400 SM DB FCS PE100</td><td>1.400</td><td>1.400</td></tr><tr><td>G400 SM DB FCS PE150</td><td>1.900</td><td>1.900</td></tr><tr><td>G400 SM App-A FCS SE100</td><td>0.800</td><td>0.800</td></tr><tr><td>G400 SM App-A DB FCS PE100</td><td>1.400</td><td>1.400</td></tr><tr><td>G400 SM App-A DB FCS PE150</td><td>1.900</td><td>1.900</td></tr></table>	配列決定キット	Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)		#1 ウェル	#2 ウェル	G400 SM DB FCS SE100	0.800	0.800	G400 SM DB FCS PE100	1.400	1.400	G400 SM DB FCS PE150	1.900	1.900	G400 SM App-A FCS SE100	0.800	0.800	G400 SM App-A DB FCS PE100	1.400	1.400	G400 SM App-A DB FCS PE150	1.900	1.900
配列決定キット	Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)																							
	#1 ウェル	#2 ウェル																						
G400 SM DB FCS SE100	0.800	0.800																						
G400 SM DB FCS PE100	1.400	1.400																						
G400 SM DB FCS PE150	1.900	1.900																						
G400 SM App-A FCS SE100	0.800	0.800																						
G400 SM App-A DB FCS PE100	1.400	1.400																						
G400 SM App-A DB FCS PE150	1.900	1.900																						
26.	8) ローディング #1 ウェルおよび #2 ウェルを透明なシーリングフィルムで密封します。 9) 試薬がカートリッジから漏れ出さないように、フィルムを指でウェルの周囲に押さえ、ウェルがしっかりと密封されていること、またフィルムとカートリッジ表面の間に気泡が存在しないことを確認します。 10) カートリッジを水平に持ち上げ、両側を両手でしっかりと握ります。カートリッジを時計回りに 10~20 回激しく振った後、反時計回りに 10~20 回激しく振ります。試薬が完全に混合していることを確認します。																							
27.	11) 混合が完了した後、ロードウェルからフィルムを慎重に取り除きます。 [注意] ・使用済みのシールフィルムは再使用しないでください。 ・ #1 ウェルおよび #2 ウェルの周囲の表面が清潔であることを確認し、交差汚染を防止してください。																							
28.	12) カートリッジを作業台の上に軽く叩き、試薬内の気泡を減少させます。 13) MDA Reagent (MDA 試薬) チューブに Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC) を 500μL 加えます。 14) チューブを 4~6 回反転させて、試薬を十分に混合します。 15) ミックスを #15 ウェルに追加します。ミックスを加える際は気泡が入らないように注意してください。 [注意] 13) ~15) は PE 配列専用です。																							

<構成②〜④を使用する場合>

10.	ライブラリの要件 総ライブラリ必要量は 1pmol 以上、ライブラリ容量は 48μL 以下である必要があります。						
11.	環化反応 以下の手順を実施します。 1) パッケージ II から Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、Cyclization Buffer (環化緩衝液) 及び Ligase (リガーゼ) をパッケージ II から取り出し、氷の入った容器に配置します。 2) 解凍後、ボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌し、試薬を十分に混合します。短時間遠心分離し、使用時に氷上に置きます。 [注意] Ligase (リガーゼ) を室温に置かず、チューブを長時間保持しないようにしてください。 3) DNA ライブラリの定量結果に基づき、バーコードアダプター番号ごとにテスト対象のライブラリを新しい 0.2mL PCR チューブにプールします。						
12.	4) プールした DNA ライブラリ約 1pmol (実際の体積はキットの推奨体積に応じて調整可能。pmol と ng の換算式は以下参照) を、以下の手順に従って 0.2 mL チューブに追加します。 $1\text{pmol の PCR 産物の質量}(\text{ng}) = \text{メインバンド DNA 断片長}(\text{bp}) \times 660\text{ng} \div 1000\text{bp}$ <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>プールした DNA ライブラリ</td><td>V</td></tr> <tr> <td>Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)</td><td>48-V</td></tr> </table>	コンポーネント	容量(μL)	プールした DNA ライブラリ	V	Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	48-V
コンポーネント	容量(μL)						
プールした DNA ライブラリ	V						
Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	48-V						
13.	[注意] ・ライブラリ投入量(μL) = 1pmol PCR 産物質量(ng)/プールされた DNA ライブラリの濃度(ng/μL) ・プールされたライブラリの体積が 48μL を超える場合、新しい						

	ライブラリを調製してください。												
14.	5) 反応系をボルテックスミキサーで混合し、ミニ遠心分離機で 5 秒間遠心分離します。 6) PCR チューブを PCR 装置に入れ、95°C で 5 分間インキュベートします。 7) インキュベーション後、すぐにチューブを取り出し、氷上で 2 分間冷却します。												
15.	8) 上記の反応系に以下の試薬を加えます。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>Cyclization Buffer (環化緩衝液)</td><td>11.6</td></tr> <tr> <td>Ligase (リガーゼ)</td><td>0.5</td></tr> </table>	コンポーネント	容量(μL)	Cyclization Buffer (環化緩衝液)	11.6	Ligase (リガーゼ)	0.5						
コンポーネント	容量(μL)												
Cyclization Buffer (環化緩衝液)	11.6												
Ligase (リガーゼ)	0.5												
16.	9) 反応ミックスをボルテックスで十分に混合し、ミニ遠心分離機で短時間遠心分離します。 10) 反応ミックスを 37°C で 30 分間インキュベートします。 11) DNA ライブラリ (反応産物) を次の反応に直接使用するか、-20°C の冷凍庫で保存します。												
17.	DNB の作成 1) Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)、Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)、Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)、Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液) をパッケージ II から取り出し、氷の入った容器に配置します。 2) 解凍後、ボルテックスミキサーで 5 秒間混合し、短時間遠心分離し、使用時に氷上に置きます。 [注意] Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC) を室温に置かず、チューブを長時間保持しないようにしてください。												
18.	3) 新しい 0.2mL PCR 8 チューブストリップに以下の表に示されている試薬を追加します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>DNA ライブラリ</td><td>20</td></tr> <tr> <td>Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)</td><td>20</td></tr> </table>	コンポーネント	容量(μL)	DNA ライブラリ	20	Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)	20						
コンポーネント	容量(μL)												
DNA ライブラリ	20												
Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液)	20												
19.	4) ボルテックスで十分に混合し、5 秒間遠心分離します。 5) ミックスを PCR 装置に入れ、反応を開始します。PCR 装置の設定は、下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋 (105°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>95°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>65°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>40°C</td><td>1 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table>	温度	時間	加熱蓋 (105°C)	オン	95°C	1 分	65°C	1 分	40°C	1 分	4°C	ホールド
温度	時間												
加熱蓋 (105°C)	オン												
95°C	1 分												
65°C	1 分												
40°C	1 分												
4°C	ホールド												
20.	6) 反応が 4°C で保持相に入った後、PCR 装置から PCR チューブを取り出します。 7) 5 秒間簡単に遠心し、チューブを氷上に置きます。 8) 以下の表に従って、試薬を追加します。 <table border="1"> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)</td><td>40</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)</td><td>4</td></tr> </table>	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)	4						
コンポーネント	容量(μL)												
Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液)	40												
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (LC)	4												
21.	9) ミックスをボルテックスミキサーで軽く混合し、ミニ遠心分離機で 5 秒間遠心分離する。 10) PCR 装置にチューブを入れ、次の反応を開始します。条件は下表に示されています。 <table border="1"> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> <tr> <td>加熱蓋 (35°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>30°C</td><td>25 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </table>	温度	時間	加熱蓋 (35°C)	オン	30°C	25 分	4°C	ホールド				
温度	時間												
加熱蓋 (35°C)	オン												
30°C	25 分												
4°C	ホールド												

22.	11) 反応が4℃で保持相に入った直後に、20μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を加えます。広口ピペットチップを使用し、5〜8 回軽く混合します。 [注意] ・DNB は、広口ピペットチップを使用してやさしく混合することが非常に重要です。 ・チューブを遠心分離やボルテックスにかけたり、振らないでください。 ・DNB は4℃で保存し、48 時間以内に使用してください。														
23.	12) DNB を定量化します。 手順 10) で得られた製品から 2μL を採取します。Qubit® ssDNA Assay Kit (Qubit® ssDNA アッセイキット)と Qubit® Fluorometer (Qubit®蛍光計)を使用して DNB を定量化します。 [注意] シーケンスには最低限の DNB 濃度 8ng/μL が必要です。配列決定の際、DNB 濃度が 8ng/μL を超える必要があります。濃度が 8ng/μL 未満の場合、新しい DNB を作成し、48 時間内に使用すること。														
24.	13) 濃度が 40ng/μL を超える場合、DNB Load Buffer I (DNB ロード緩衝液 I)で DNB を 20ng/μL に希釈してロードする必要があります。 [注意] 希釈が必要な場合、使用直前に希釈してください。														
25.	DNB ロード用の試薬の準備 ＜構成部品⑩〜⑫を使用する場合＞の「21. DNB ローディング用試薬の準備」と同じ手順を実施してください。														
26.	配列決定カートリッジの準備 1) 〜4) は＜構成部品⑩〜⑫を使用する場合＞の「21. DNB ローディング用試薬の準備 1) 〜4)」と同じ手順を実施します。														
27.	5) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って#1 ウェルに試薬を追加します。 <table><tr><th>配列決定キット</th><th>dNTPs Mix (dNTPs ミックス) ローディング容量(mL)</th></tr><tr><td>G400 SM FCS SE100</td><td>0.800</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE100</td><td>1.400</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE150</td><td>1.900</td></tr></table>	配列決定キット	dNTPs Mix (dNTPs ミックス) ローディング容量(mL)	G400 SM FCS SE100	0.800	G400 SM FCS PE100	1.400	G400 SM FCS PE150	1.900						
配列決定キット	dNTPs Mix (dNTPs ミックス) ローディング容量(mL)														
G400 SM FCS SE100	0.800														
G400 SM FCS PE100	1.400														
G400 SM FCS PE150	1.900														
28.	6) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って試薬を#2 ウェルに追加します。 <table><tr><th>配列決定キット</th><th>dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)</th></tr><tr><td>G400 SM FCS SE100</td><td>1.600</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE100</td><td>2.800</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE150</td><td>3.800</td></tr></table>	配列決定キット	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)	G400 SM FCS SE100	1.600	G400 SM FCS PE100	2.800	G400 SM FCS PE150	3.800						
配列決定キット	dNTPs Mix II (dNTPs ミックス II)ローディング容量(mL)														
G400 SM FCS SE100	1.600														
G400 SM FCS PE100	2.800														
G400 SM FCS PE150	3.800														
29.	7) 適切な容量範囲のピペットを取り、次の表に従って試薬を#1 ウェルおよび#2 ウェルに追加します。 <table><tr><th rowspan="2">配列決定キット</th><th colspan="2">Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)</th></tr><tr><th>#1 ウェル</th><th>#2 ウェル</th></tr><tr><td>G400 SM FCS SE100</td><td>0.800</td><td>0.800</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE100</td><td>1.400</td><td>1.400</td></tr><tr><td>G400 SM FCS PE150</td><td>1.900</td><td>1.900</td></tr></table>	配列決定キット	Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)		#1 ウェル	#2 ウェル	G400 SM FCS SE100	0.800	0.800	G400 SM FCS PE100	1.400	1.400	G400 SM FCS PE150	1.900	1.900
配列決定キット	Sequencing Enzyme Mix (配列決定酵素ミックス) ローディング容量(mL)														
	#1 ウェル	#2 ウェル													
G400 SM FCS SE100	0.800	0.800													
G400 SM FCS PE100	1.400	1.400													
G400 SM FCS PE150	1.900	1.900													
30.	次は＜構成部品⑩〜⑫を使用する場合＞の「21. DNB ローディング用試薬の準備 8) 〜15) は」と同じ手順を実施します。														

＜構成部品 OneStep DNB Make Reagent Kit を使用する場合＞

10. サンプル濃度の算出

①混合する各サンプルの濃度を計算します。DNA ライブラリ濃度 (ng/μL) は、dsDNA HS アッセイキットと Qubit Fluorometer(Qubit 蛍光計)を用いて定量します。

濃度は、以下の式を用いて ng/μL から fmol/μL に変換する必要があります。

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L})=3030 \times C(\text{ng}/\mu\text{L})/(N \times 2)$$

N は、DNA 断片 (その長さには関連するアダプター配列が含まれる) 内のヌクレオチドの平均数を表します。C (ng/μL)は DNA ライブラリ濃度を表します。

②下記表に従って適切なインプットを選択します。

インプット量は以下の式を用いて計算できます。

$$V(\mu\text{L})= \text{インプット}(\text{fmol})/C(\text{fmol}/\mu\text{L})$$

ライブラリタイプ	dsDNA 濃度要件 (fmol/μL)	インプット (fmol)
5'非リン酸化PCR ライブラリ	≥10.0	200
5'非リン酸化PCR フリーライブラリ	≥7.5	150

11. 試薬の調製

①冷凍庫から dsDNA ライブラリ、Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)、Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液) (OSApp-V4.0)、Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液) (OS-V4.0)、及び Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を取り出し、氷ラックで約 30 分間解凍します。

②解凍後、5 秒間ボルテックスミキサーを使用して試薬を混合し、5 秒間遠心して氷上に置きます。

12. リン酸化およびハイブリダイゼーション

①冷凍庫から Conversion Enzyme (変換酵素)を取り出し、5 秒間遠心し氷上に置きます。

②0.2mL PCR 8-チューブストリップ又は PCR チューブを取り出し、下記表に従って氷上で反応混合物 (リン酸化およびハイブリダイゼーション反応ミックス) を調製します。

コンポーネント	容量(μL)
Low TE Buffer (低 TE 緩衝液)	20-V
Make DNB Buffer (DNB 緩衝作成液) (OSApp-V4.0)	20
dsDNA ライブラリ	V
Conversion Enzyme (変換酵素)	0.5
総容量	40.5

V は、手順 1.で計算したライブラリインプットの総量から算出されます。

③反応ミックスをボルテックスでよく混合し、5 秒間遠心分離します。

13. ④ミックスを PCR 装置にセットし、下記条件に従って反応を開始します。

温度	時間
加熱蓋 (105°C)	オン
37°C	5 分
95°C	3 分
40°C	3 分
4°C	ホールド

⑤反応が 4°Cでホールドされたら、0.2mL PCR 8-チューブストリップ又は PCR チューブを PCR 装置から取り出し、5 秒間遠心分離します。

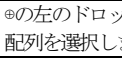
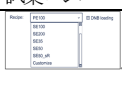
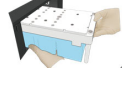
14.	DNB の作成 ①冷凍庫から Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)を取り出して 5 秒間遠心分離し、使用するまで氷上に置きます。 〔注意〕 - Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)は常に氷上に置くこと。 - チューブを長時間保持しないこと。 ②チューブを氷上に置き、下記表に従って DNB 作成反応ミックスを調製します。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>コンポーネント</th><th>容量(μL)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液) (OS-V4.0)</td><td>40</td></tr> <tr> <td>Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)</td><td>2</td></tr> <tr> <td>総容量</td><td>42</td></tr> </tbody> </table> ③ボルテックスでよく混合し、5 秒間遠心分離します。 ④次の反応のためにチューブを PCR 装置にセットします。反応条件は下表の通りです。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>温度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>加熱蓋(35°C)</td><td>オン</td></tr> <tr> <td>30°C</td><td>30 分</td></tr> <tr> <td>4°C</td><td>ホールド</td></tr> </tbody> </table> 〔注意〕 - 反応実行中、PCR 装置の一部のサンプルブロックは、蓋が動作温度まで加熱又は冷却されている間、室温のままになる場合があります。このようなタイプの PCR 装置では、DNB 反応中に加熱蓋の予熱が動作温度に達していることを確認する必要があります。 - 加熱蓋の温度は 35°C、又は 35°C に可能な限り近い温度に設定することを推奨します。 ⑤反応が 4°C でホールドされたら、直ちに 20μL の Stop DNB Reaction Buffer (DNB 反応緩衝停止液)を RCA 反応チューブに加える。広口ピペットチップを用いて 5~8 回ピペッティングし、やさしく混合する。DNB は使用するまで 4°C で保存します。 〔注意〕 - DNB は 48 時間以内に使用すること。 - DNB の移し替えや混合には、フィルターなしの広口ピペットチップを使用すること。 - 遠心分離、ボルテックス、激しいピペッティング、チューブの振盪は行わないこと。	コンポーネント	容量(μL)	Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液) (OS-V4.0)	40	Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)	2	総容量	42	温度	時間	加熱蓋(35°C)	オン	30°C	30 分	4°C	ホールド
コンポーネント	容量(μL)																
Make DNB Enzyme Mix I (DNB 酵素ミックス I 作成液) (OS-V4.0)	40																
Make DNB Enzyme Mix II (DNB 酵素ミックス II 作成液) (OS-V4.0)	2																
総容量	42																
温度	時間																
加熱蓋(35°C)	オン																
30°C	30 分																
4°C	ホールド																
15.	DNB の定量 DNB の作成が完了したら、2μL 採取し、Qubit ssDNA Assay Kit (Qubit ssDNA アッセイキット)と Qubit Fluorometer (Qubit 蛍光計)を使用して DNB を定量化します。 〔注意〕 - DNB 濃度は 8ng/μL 以上である必要があります。 - 濃度が 8ng/μL より低い場合、DNB の再調製を行い、48 時間以内に使用すること。																

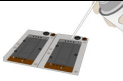
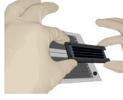
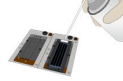
(3) 本体の起動

1.	電源コードの一方の端を本体に接続し、もう一方の端を主電源に接続します。 UPS が準備されている場合は、UPS 電源コードの一方の端を本体に接続し、もう一方の端を主電源に接続します。
2.	電源スイッチを  の位置にします。
3.	メインインターフェイスで  をタップします。
4.	 メーカーから提供されたユーザー名とパスワードを入力し、「Login (ログイン)」をクリックしてメインインターフェイスに入ります。

(4) シーケンス方法

1.	 メインインターフェイスで、「Sequence (配列決定)」をタップして、DNB 読み込みインターフェ
----	---

		イスに入ります。
2.		「DNB ID」の右側の  をクリックするとレーンの情報が表示されます。
3.		「DNB ID」ボックスをタップし、試験管の QR コードをスキャンします。 試験管に QR コードがない場合は、画面上のキーボードまたはキーボードで試験管のシリアル番号を入力します。
4.		 の左のドロップダウンメニューから、異なるレーンのバーコード配列を選択します。
5.		試薬コンパートメントの扉を開き、片手で試料針を静かに持ち上げ、もう一方の手で洗浄試薬チューブを取り外し、サンプルチューブをロードしてから、チューブの底に到達するまで試料針の先端をゆっくりと下げます。 〔注意〕 シーケンサーを使用して DNB がロードされる場合、この手順を実行します。そうでない場合は、この手順をスキップします。
6.		試薬コンパートメントの扉を開けます。
7.		「Recipe (レシピ)」ドロップダウンメニューで配列決定レシピを選択し、ワンクリック配列決定実行 (PE150、SE50 など)、およびユーザーがカスタマイズした実行「Customize (カスタマイズ)」を選択します。 〔注意〕 配列決定ソリューション「SE50_sR」は、Small RNA (小 RNA) 配列決定用です。
8.		ワンクリック配列決定を選択し、DNB がシーケンサーにロードされる場合、「DNB loading (DNB のロード)」にチェックを入れます。それ以外の場合は空白のままにして、次の手順に進みます。 「Customize (カスタマイズ)」を選択した場合は、引き続き次の手順を実行します。
9.		配列決定を開始する手順を選択してください。
10.		読み取り長を選択します。たとえば、PE100 では、Read1 に 100、Read2 に 100 を入力します。
11.		バーコードの長さを 6 または 10 から選択します。デュアルバーコード配列決定の場合、デュアルバーコードの長さを入力する必要があります。シングルバーコード配列決定実行の場合、デュアルバーコードは空白のままにします。
12.		バーコード逆多重化のレーンを選択します。
13.		Read1 または 2 の読み取り長の任意の位置の暗反応を選択します。 暗反応：光学情報のキャプチャなしの化学反応のみ
14.		「Confirm (確認)」をクリックします。
15.		カーソルをブランクの「Reagent ID (試薬 ID)」に移動し、カートリッジ情報を手動で入力するか、バーコードスキャナーを使用してカートリッジのバーコードをスキャンします。
16.		試薬コンパートメントの扉を開きます。クリーニングカートリッジ 1 のハンドルを片手で持ち、もう一方の手をカートリッジの下に添えて支え、コンパートメントからゆっくりと取り外します。
17.		ほこりのない紙またはほこりのない布を実験室グレードの水で湿らせ、それを使用してコンパートメントの底面と側面を拭き、清潔で乾燥した状態に保ちます。
18.		片手で試薬カートリッジのハンドルを持ち、もう一方の手を下に置いて支えます。新しいカートリッジを、カバーに印刷されている方向に従って、止まるまでコンパートメントにスライドさせます。試薬カートリッジが正しい位置にあることを確認し、試薬コンパートメントの扉を閉めます。
19.		「Next (次へ)」をタップします。

20.		フローセルコンパートメントの扉を開き、洗浄に使用するフローセルの片側を押し、もう一方の手でフローセル取り付けボタンを押します。真空を解除した後、洗浄のためにフローセルをステージから取り外します。
21.		ダストブローマーを使用して、フローセルステージとフローセルの背面のほこりを取り除きます。ステージの表面に不純物がある場合は、フローセルを適切に保持できるように、湿ったほこりのない紙で軽く拭いてください。
22.		フローセル接続ボタンを押します。
23.		新しいフローセルまたはロードされたフローセルを取り出します。左側に2つの位置合わせ孔があり、右側に1つの孔があります。ラベルは右側にあります。両手でフローセルの端を持ちます。
24.		フローセルの孔をフローセルステージの位置決めピンに合わせます。フローセルをピンと一直線に保つために、フローセルを左上隅に45°の角度(MGIDL-200Hにフローセルをロードするときには右上隅に45°)で静かにスライドさせます。ステージ上のフローセルの左側と右側を同時に押して、フローセルがステージ上に正しく収まるようにします。 [注意] フローセルは壊れやすいので、フローセルの取り扱いには注意してください。
25.		陰圧が80〜99kPaの範囲にあることを確認します。
26.		ダストブローマーを使用して、フローセル表面のほこりを取り除き、フローセルコンパートメントの扉を閉めます。
27.		「Next(次へ)」をクリックすると、本体は自動的にフローセルIDを入力します。自動入力機能が機能しない場合は、カーソルを「Flow cell ID(フローセルID)」の空白に移動し、IDを手動で入力します。
28.		実行パラメーターを確認して、すべての情報が正しいことを確認します。情報が正しいことを確認した後、「Start(開始)」をクリックします。エラーを見つけた場合は、「Previous(戻る)」をタップして前のインターフェイスに戻り、パラメーターをリセットします。
29.		システムは「Proceed with sequencing(配列決定の開始)」のダイアログボックスを表示します。「Yes(はい)」をクリックして配列決定を開始します。

(5) 試薬カートリッジとフローセルの廃棄

配列決定後または本体の電源を切る前に、フローセルを取り外してフローセルステージを清掃します。これにより、粒子状物質が本体に落下して損傷を引き起こすのを防ぎます。

1.	保護具を着用してください。
2.	フローセルコンパートメントの扉を開き、フローセルを取り外します。フローセルが本体に落下するのを防ぎ、フローセルの損傷を防ぐために、片手でフローセルを閉めます。もう一方の手でフローセル接続ボタンを押して、ステージからフローセルをリリースします。フローセルを取り外します。
3.	試薬コンパートメントの扉を開き、試薬カートリッジを取り外します。ベースを上に向かって、試験管を取り外します。
4.	クリーニングカートリッジと試験管に残っている洗浄液を空にし、適切な廃棄物容器に入れます。現地の規制および実験室の安全基準に従って、試験管、フローセル、試薬カートリッジを廃棄してください。

(6) 電源を切る

1.	 をタップし、「Shut down(終了)」を選択します。ポップアップダイアログボックスで、「Shut down(終了)」を選択します。
2.	電源スイッチを○の位置にします。
3.	電源コードを電源ソケットまたはUPSから取り外します。

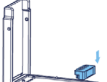
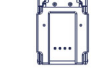
[注意]

本体の電源を切る前に、配列決定の実行と洗浄が完了し、制御ソフトウェアがシャットダウンし、フローセルコンパートメントの扉が閉じているこ

とを確認してください。

これに従わなかった場合、制御用ソフトウェアが損傷する可能性があります。

(7) MGIDL-200H 使用方法

1.		両側のバックルを押してカバーを開きます。
2.		ガスケットをガスケット溝に配置して、ガスケットが平らであることを確認します。
3.		シーケンシングフローセルはポジショニングガイドに合わせて、サンプラーに配置します。
4.		両側のバックルを押して、カバーを閉じます。
5.		サンプラーの背面を上に向けて、流路の入口がガスケットの穴と揃っていること、および異物をブロックしていないことを確認します。

3. 使用方法に関連する使用上の注意

- 本体上部に液体を置かないこと。
- 構成品の消耗品は販売元指定のものを使用すること。
- 検体中に泡や膜があると正確な結果が得られないことがあるため、本品での測定前に泡や膜がないことを確認すること。
- 試薬は指定の位置にセットすること。誤った位置にセットすると、エラーになることがある。
- 取扱説明書に記載されていない保守点検または修理作業を行わないこと。取扱説明書に記載されていない保守点検作業および修理の一切は販売元が指定した者が行う。
- 機器内部の手の届かない部分で液体がこぼれたり、漏れたりした場合は、販売元まで連絡して指示を受けること。
- 本品の取扱説明書およびソフトウェアの画面並びに各測定キットの添付文書にある全ての警告、注意事項および説明に従うこと。
- 廃棄物容器は、チューブを介して本体に接続されている。液体漏れや生物学的危険を回避するために、廃棄物容器の状態を頻繁に監視し、時間内に空すること。空になったら、廃棄物容器を清掃して消毒すること。
- 廃棄物、廃液および試薬の廃棄方法は、施設の廃棄物処理基準に従うこと。
- 検体の取り扱い時および保守点検業務の実施時には、普遍的予防策に従い、特に機器の内部および周囲で液体を取り扱う際には、手袋、保護メガネおよび作業着をはじめとする保護具または保護衣を必ず着用すること。
- 次回使用時に支障のないように本体の定期的な保守点検を実施すること。

【使用上の注意】

〈重要な基本的注意〉

- 本体の開梱、稼働、設置及びソフトウェアのインストール・アンインストールは、販売元または訓練を受けた担当者のみが行うこと。
[不適切な操作により不正確な配列決定結果または本体の損傷を引き起こす可能性がある。]
- 取扱説明書に記載された条件下で動作することを確認すること。
[本体の損傷、配列決定結果の誤り、または怪我の恐れがある。]
- 測定結果に基づく臨床判断は、臨床症状やその他の検査結果等と合わせて医師が総合的に判断すること。
- 操作の前に、本体のコンポーネントが完全にインストールされていることを確認すること。
[怪我をする可能性がある。]

- (5) フローセルコンパートメントにレーザーが取り付けられているため、配列決定を実行する前に、フローセルコンパートメントの扉が閉じていることを確認すること。[レーザー光線により目の怪我や火傷を引き起こす可能性がある。]
- (6) 本体のカバーを取り外したり、内部コンポーネントを外部に露出させたりしないこと。[感電の原因になる。]
- (7) 本体にはメーカーから提供されたソフトウェア以外をインストールしないこと。ウイルス対策ソフトウェアをインストールする必要がある場合は、事前に販売元に問い合わせること。[通常の機能に干渉したり、データ損失の原因になる可能性がある。]
- (8) 配列決定中は、本体のコンパートメントの扉を開けないこと。[本体の損傷及び配列決定結果への悪影響の可能性がある。]
- (9) 配列決定中にフローセルステージに触らないこと。[フローセルステージの温度は50°Cあるいはそれ以上に上がる可能性があるため、火傷が起こる可能性がある。]
- (10) 配列決定中に本体をぶつけたり、動かしたり、振動させたり、衝撃を与えたりしないこと。
- (11) 本体が置かれている同じ場所に遠心分離機やボルテックスなどの他の機器を置かないこと。[他の機器が引き起こした振動により配列決定結果の品質を低下させる可能性がある。]
- (12) 本体は可燃性または爆発性の液体、蒸気、または気体のある場所で使用しないこと。
- (13) 本品内の部品の交換を行わないこと。[データの喪失を招き、システムの性能に影響を与え、本品の破損を招くおそれがある。]

〈その他の注意〉

- (1) 精度管理は、ランごとに実施することを推奨する。
- (2) 操作中に異常が発見された場合には、安全な状態で本体の作動を止めるなど適切な措置を講じること。
- (3) 本体の電源を切るときは定められた手順に従うこと。
- (4) 本体を移動しないこと。移動する場合は、販売元へ連絡すること。
- (5) 暫く使用しなかった本品を再使用するときには、使用前に本品が正常にかつ安全に作動することを必ず確認すること。
- (6) 患者検体に接触する全ての物（人体組織を含む検体や試薬、又は人体組織と接触した本品の部位等）に感染の危険性があると考え、各施設の感染性医療廃棄物取扱い規定に従って取り扱うこと。
- (7) 床に落とした専用試薬、消耗品は使わないこと。汚れが付着し測定結果に影響する可能性がある。
- (8) 販売元指定の本品専用オプション以外の機器は、本品に接続しないこと。
- (9) ソフトウェア作動中は他のソフトウェアを起動しないこと。[データ喪失のおそれがある。]
- (10) 消耗品は販売元が推奨する製品を使用すること。[販売元が推奨する製品以外の消耗品を使用した場合には、機器の性能及び安全性が低下することがある。]
- (11) 故障した際は、取扱説明書に明示された範囲で適切な措置を行い、販売元に連絡して修理すること。
- (12) 試験管や試薬カートリッジを本体に置かないこと。[本体に液体が染み込むと、誤動作する可能性がある。]

【保管方法及び有効期間等】**

貯蔵・保管方法

- (1) 本体

項目	保管温度	相対湿度 (非結露)
使用時	19~25°C	20~80%
輸送・保管時	-20~50°C	15~90%

高度：3,000 m 未満

耐用期間：7年

- (2) 構成品

項目	保管温度	相対湿度 (非結露)
保管時	-25~15°C	15~90%
輸送時	-80~15°C	—

使用期間：12 ヶ月

【保守・点検に係る事項】*

1. 使用者による保守点検事項

取扱説明書「メンテナンス手順」の章に記載されたとおりに行うこと。

- (1) 洗浄

メンテナンスの洗浄液と頻度

洗浄の種類	洗浄液	頻度
定期洗浄	実験室グレードの水	● 本体が 12 時間以上使用されていない場合は、配列決定の前に定期洗浄を行ってください。 ● 各 SE 配列決定の実行後、12 時間以内に定期洗浄を実行します。
メンテナンス洗浄	#15 ウェルには 1M NaCl 及び 0.05%Tween-20、その他のウェルには 0.05%Tween-20 (初回:メンテナンス洗浄)	● SE 配列決定: 毎週 ● PE 配列決定: 各配列決定実行後
	0.1M NaOH (2 回目:メンテナンス洗浄)	
	実験室グレードの水 (3 回目:メンテナンス洗浄)	
DNBTube 洗浄 (選択)	新鮮な実験室グレードの水 (4 回目:定期洗浄)	—
	0.05%Tween-20 (1 回目洗浄) 0.1MNaOH (2 回目洗浄) 実験室グレードの水 (3 回目洗浄)	

洗浄方法

洗浄の種類	説明
完全洗浄	手順1-メンテナンス洗浄、手順2-定期洗浄。
メンテナンス洗浄	手順: カートリッジ4の清掃 → カートリッジ3の清掃 → カートリッジ2の清掃 パイプライン内の残留試薬とタンパク質を除去し、詰まりのリスクを減らします。 手順: カートリッジ1の清掃 → Air Prime (エアープライム)
定期洗浄	残留試薬を除去し、二次汚染のリスクを減らします。

- 配列決定の完了後、右記のインターフェイスが表示されたら本体を 24 時間以内に洗浄する必要があります。
- シーケンサーが A)PE 実行または B)DNB ロード/ポストロードのいずれかに使用された場合、完全洗浄が必要です。SE 実行には定期洗浄で十分です。
- 完全洗浄が完了した後、本体が 12 時間以上アイドル状態であった場合は、使用前に定期洗浄を再度実行してください。
- エンジニアがシステムメンテナンスを実行した後、定期洗浄を実行します。
- チューブ、試料針、または試薬にさらされているその他のアクセサリを交換した後、完全洗浄を実行します。
- シーケンサーの電源を 7 日間以上オフにする場合は、電源をオフにする



- る前とオンにした後に、メンテナンス洗浄を実行してください。
- シーケンサーが7日間以上アイドル状態になっている場合は、配列決定の前に完全洗浄を実行します。
 - フローセルに不純物が見つかった場合は、完全洗浄を実行してください。

洗浄剤の調整

- 以下の表に従って 0.05% Tween-20 を準備します(4°Cで保管した場合、最長 28 日間使用できます)。

試薬	容量
100% Tween-20	0.5mL
実験室グレードの水	999.5mL

- 以下の表に従って、1M NaCl+0.05% Tween-20 を準備します(4°Cで保管した場合、最長 28 日間使用できます)。

試薬	容量
5M NaCl 溶液	200mL
100% Tween-20	0.5mL
実験室グレードの水	799.5mL

- 次の表に従って 0.1M NaOH を準備します(4°C で保管した場合、最長 28 日間使用できます)。

試薬	容量
2M NaOH 溶液	50mL
実験室グレードの水	950mL

カートリッジの洗浄

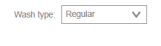
- 空のクリーニングカートリッジと完全洗浄のための洗浄用フローセルが本体と共に提供されます。
- 洗浄剤を補充する前に、クリーニングカートリッジを洗浄してください。20 回使用した後は、洗浄剤を交換してください。
- 以前の実行で使用したフローセルは、洗浄用フローセルとして使用できます。各フローセルは、最大 20 回の完全洗浄に使用できます。
- クリーニングカートリッジ 1 の洗浄：きれいなクリーニングカートリッジと 0.5mL クライオチューブを用意し、実験室グレードの水をサイロチューブとクリーニングカートリッジ(すべてのウェル)に追加して、最終的に 90%の容量にし、洗浄試薬カートリッジ 1 としてマークします。
- クリーニングカートリッジ 2 の洗浄：きれいなクリーニングカートリッジと 0.5mL クライオチューブを用意し、実験室グレードの水をサイロチューブとクリーニングカートリッジ(すべてのウェル)に追加して、最終的に 90%の容量にし、洗浄試薬カートリッジ 2 としてマークします。
- クリーニングカートリッジ 3 の洗浄：きれいなクリーニングカートリッジと 0.5mL クライオチューブを用意し、50mL の 0.1M NaOH を大きなウェルに、6mL の 0.1M NaOH を小さなウェルに、400μL の 0.1M NaOH を 0.5mL クライオチューブに追加します。洗浄試薬カートリッジ 3 としてマークします。
- クリーニングカートリッジ 4 の洗浄：きれいなクリーニングカートリッジと 0.5mL クライオチューブを用意し、50mL の 0.05% Tween-20 溶液を大きなウェルに加え、6mL の 1M NaCl+0.05% Tween-20 溶液を #15 ウェルに加え、400μL の 1M NaCl+0.05% Tween-20 溶液を 0.5mL クライオチューブに加え、6mL の 0.05% Tween-20 溶液を残りのウェルに加えます。洗浄試薬カートリッジ 4 としてマークします。

[注意]

大きいウェルは、#1、2、9、10、17、18

小さいウェルは、#3、4、5、6、7、8、11、12、13、14、15、16

(2) 定期洗浄

1.	クリーニングカートリッジ 1 を使用します。試薬コンパートメントの扉を開きます。クリーニングカートリッジ 1 のハンドルを片手で持ち、もう一方の手をカートリッジ 1 の下に添えて支えます。カートリッジカバーに印刷されている方向に従って、止まるまでゆっくりと試薬コンパートメントにスライドさせます。試薬コンパートメントの扉を開めます。
2.	 洗浄インターフェイスで、「Wash type(洗浄の種類)」リストから「Regular(定期)」を選択します。
3.	 画面上の手順に従って、洗浄用フローセル、試験管、およびクリーニングカートリッジを読み込みます。全てのコンパートメントの扉を開めます。

	ントの扉を開めます。
4.	洗浄インターフェイスで「Wash(洗浄)」をタップすると、確認のダイアログボックスが現れます。「Yes(はい)」を選択して洗浄を開始します。洗浄開始後、フローセルコンパートメントの扉を開き、洗浄液がフローセルを通過するかどうかを確認します。
5.	定期洗浄のみを実行する場合は、この手順で洗浄用フローセルの状態を確認してください。気泡が多い場合は、洗浄を続けてください。そうでない場合は、洗浄を停止し、フローセルを交換して洗浄を開始します。メンテナンス洗浄後に定期洗浄を実行する場合は、この手順をスキップしてください。
6.	 インターフェイスが左図のように表示されたら、定期洗浄は終了します。

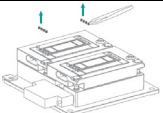
(3) メンテナンス洗浄

1.	配列決定前にアカウントにログインします。メインインターフェイスで「Wash(洗浄)」をタップします。または配列決定後に、配列決定完了インターフェイスで「Wash(洗浄)」をタップします。
2.	洗浄インターフェイスで、「Wash type(洗浄の種類)」リストから「Maintenance(メンテナンス)」を選択します。
3.	クリーニングカートリッジ 4 を使用します。試薬コンパートメントの扉を開きます。クリーニングカートリッジ 4 のハンドルを片手で持ち、もう一方の手をカートリッジの下に添えて支えます。カートリッジカバーに印刷されている方向に従って、止まるまでゆっくりと試薬コンパートメントにスライドさせます。試薬コンパートメントの扉を開めます。
4.	インターフェイスの洗浄ボタンをクリックします。
5.	画面上の手順に従って、洗浄用フローセル、試験管、およびクリーニングカートリッジを読み込みます。全てのコンパートメントの扉を開めます。
6.	ドロップダウンメニューからメンテナンス洗浄を選択して、メンテナンス洗浄を開始します。この洗浄には約 25 分かかります。
7.	この手順で洗浄するフローセルの状態を観察します。気泡が多い場合は、洗浄を続けてください。そうでない場合は、洗浄を停止し、フローセルを交換して洗浄を開始します。
8.	 インターフェイスが左図のように表示されたら、「Yes(はい)」をクリックして針を持ち上げ、クリーニングカートリッジを交換します。
9.	クリーニングカートリッジ 3 を使用し、メンテナンス洗浄を続けます。この洗浄には約 25 分かかります。
10.	 インターフェイスが左図のように表示されたら、「Yes(はい)」をクリックして針を持ち上げ、クリーニングカートリッジを交換します。
11.	クリーニングカートリッジ 2 を使用し、メンテナンス洗浄を続けます。この洗浄には約 25 分かかります。
12.	 インターフェイスが左図のように表示されたら、「No(いいえ)」をクリックしてメンテナンス洗浄を終了します。

(4) シーリングガスケットの交換

DNB の読み込みに失敗する、またはフローセルまたは廃液チューブに気泡が存在する場合、シーリングガスケットを交換することが勧められます。

- 流体工学ラインの気密性の損傷を防ぐために、シーリングガスケットを頻繁に交換しないでください。ガスケットを交換する前に、洗浄用フローセルを交換し、洗浄手順を実行してください。洗浄後、フローセルコンパートメントを開き、一連の気泡がフローセルを通過するかどうかを確認します。通過する場合、ガスケットを交換します。
- 交換用にメーカーが提供するピンセットとシーリングガスケットを使用します。
- シーリングガスケットを本体に落とさないでください。

1.		ピンセットで左右のシーリングガスケットを取り外します。
2.	ピンセットで新しいガスケットを取り付けます。ガスケットの上部が図のように上を向いており、ガスケットがしっかりと平らに取り付けられていることを確認します。	

(5) 廃棄物容器のメンテナンス

廃棄物容器は、チューブを介して本体に接続されます。液体漏れや生物学的危険を回避するために、廃棄物容器の状態を頻繁に監視し、時間内に空にします。空になったら、廃棄物容器を清掃して消毒します。

次の条件のいずれかが満たされている場合は、廃棄物容器を空にします

- 廃棄物レベルが、配列決定前に最大量の3分の2に達している

- 廃棄物容器のアイコンが配列決定中に  に変わる

1.	保護具を着用してください。
2.	廃棄物容器からチューブなしの蓋を取り外します。
3.	廃棄物を適切な廃棄物容器に注ぎ、現地の規制と実験室の安全基準に従って廃棄してください。
4.	十分な実験室グレードの水を廃棄物容器に加え、必要に応じて蓋を容器に取り付け、すべての内壁がきれいになるまで静かに回します。
5.	実験室グレードの水を適切な廃棄物容器に注ぎます。必要に応じて、手順3～5を繰り返します。
6.	75% アルコールワイプで廃棄物容器の表面と開口部を清掃します。廃棄物が容器に残っていないことを確認してください。
7.	蓋を廃棄物容器に取り付けます。

2. 1年度毎の保守点検

- (1) 予防保守サービスを毎年スケジュールすることを推奨する。
- (2) サービス契約を締結していない場合は、販売元に連絡して、予防保守サービスを手配すること。

【製造販売業者及び製造業者の氏名又は名称等】*

〈製造販売業者〉

業者名：株式会社ICST

TEL：048-857-8026

〈外国製造業者〉

業者名：Wuhan MGI Tech Co., Ltd.

国名：中華人民共和国