

Misequence—测序前文库的稀释变性

1. 将构建好的各文库进行稀释（稀释液为溶解文库的缓冲液或超纯去离子水；稀释前各文库浓度必须用 qPCR 进行绝对定量），使其终浓度均为 10nM（1nM 为 10^{-9} mol/L； $1N=10^3mM=10^6\mu M=10^9nM=10^{12}pM$ ）；
2. 每个文库分别取 10 μ l 混合均匀；
3. 取 2 μ l 混合后的混文库，加 8 μ l 缓冲液（Hybridization Buffer，测序试剂盒自带）混合均匀，共 10 μ l，各文库终浓度为 2nM；
4. 取 2 μ l 1M 的 NaOH（最好新鲜配置，未变质，变质的 NaOH 容易引起文库变性不完全，导致测序失败或较少的数据量），加 8 μ l 缓冲液（Hybridization Buffer），稀释成 10 μ l 0.2M 的 NaOH 溶液备用；
5. 将 10 μ l 2nM 的混文库和 10 μ l 0.2M 的 NaOH 混合均匀，将混文库进行变性 5min，终浓度为 1nM 的混文库和 0.1M 的 NaOH（总体积 20 μ l）；
6. 向上述 20 μ l 混文库中加 1980 μ l 缓冲液（Hybridization Buffer），将文库稀释至 10pM（ 10^{-12} mol/L），共得到稀释后的文库 2000 μ l；
7. 取 600 μ l 10pM 上述混文库，上机测序。
- 8.

Misequence—上机测序流程

1. 编制测序表格，并将其拷贝到 Computer / Data (D) / Illumina / Miseq Control Software / Samplesheets / 自建的文件夹位置；文件拷贝到指定位置后，注意直接将 U 盘拔出；
2. 将 wash bottle 中的洗液加入到 wash tray 平台中(加满),放回原处进行 washing 冲洗（测序前仪器进行清洗）；
3. 取出 Miseq V2 Reagent Kit, 将 PE Miseq Flowcell 芯片用 ddH₂O 冲洗干净(正反面的钠盐影响测序)后晾干，放入测序仪中（仪器会自动识别标识）；
4. 如果芯片已经过期（Flow cell），则需要按以下步骤登陆：登陆 www.illumina.com 网站▶ 点击 Myillumina▶ Account Login▶ 输入账

号 Username 密码 password Login resource Miseq Self service

输入测序代码 (MO1198) → Type of Override Code 对话框的下拉菜单中选择 RFID override → get code 获得 Flow cell 芯片新的 ID 标识;

5. 将获得的 Flow cell ID 输入到第四步的 get code 出现的方框中 → 点击 continue;
6. 将准备好的 10pM 上机样品取 600 μ l 加入到 PAR2 试剂盒中, 并放到测序仪器上 (置换 Wash Tray), 并放入 incorporation Buffer (测序试剂盒自带), 输入相应的信息 ms0015518-PR2 (试剂盒编号) 353.1ml (置换 wash bottle);
7. 根据提示导入编制好的测序表格 (样品信息), 并输入相应的编号 ms0000104-500;
8. Next 进行 pre-run 程序 (如果 incorporation Buffer 过期的话, 会通不过检测, 不予理会);
9. 完成 pre-run 后, 出现各项指标都提示通过;
10. Start run 开始测序 (注意测序开始后不能震动测序仪, 不可打开 Flow cell 和 wash tray 的盖子, 以免影响或终止反应)。

测序表格编制方法一以 mRNA 测序为例

1. 双击 Illumina Experiment Manager 图标, 运行该程序;
2. 单击 Create Sample Sheet 图标, 选中 Miseq 图标 (仪器选择), 单击 Next 图标;
3. 出现 Sample Sheet Wizard-Miseq Workflow Selection 界面, Select Category 选择 RNA Sequencing 图标, Select Application 选择 RNASeq 图标, 单击 Next 图标;
4. 出现 Sample Sheet Wizard- Workflow Parameters 界面:
Reagent Cartridge Barcode 对话框中输入试剂盒的条形码;
Sample Prep Kit 选择 Truseq LT;
Index Reads 选择 1;
Project name 自己填写 (如: RNA sequencing);

Experiment name 自己填写（如：RNA sequencing）；

Investigator name 自己填写（如名字的全拼）；

Description 对实验进行描述（如 mRNA sequencing）；

Date 为开始实验的日期；

Read type 选择 paired end；

Cycles Read 1 填写数字为 251；

Cycles Read 2 填写数字为 251；

RNA-seq Workflow-Specific Settings 选择默认值（Use Adapter Trimming）；

5. 上述参数设置完后，单击 Next 图标，出现 Sample Sheet Wizard-Sample Selection 界面；
6. 单击 New Plate 图标，出现 Sample Sheet Wizard-Assay Parameters 界面；
7. Unique Plate Name 对话框中输入人为自定的名称(如 20140722), Index Reads 选择默认值为 1，单击 Next 图标；
8. 出现 Sample Sheet Wizard-Plate Samples 界面，输入 Sample ID, Sample Name 及 Index1，单击 Finish 图标；
9. 单击保存，文件名为 20140722；选中 A01 和 A02，单击 Add Selected Samples 图标，单击 Finish 图标，出现文件保存对话框，输入文件名称 20140722，单击保存，出现编辑好的文件（excel 格式）；
10. 如果编制表格时出现错误，可以调用编制文件进行编辑（Edit Sample Plate），更正错误。