

TruSight One

「高効率・高感度な臨床研究を可能にする
TruSight Oneシーケンスパネル～ウェット編～」

Dec 5, 2014



山重 リエ
イルミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.
Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

illumina®

ターゲットリシーケンスと全ゲノムシーケンス

ターゲットシーケンス

<特徴>

- ・興味のある領域のみを高感度（高いカバレッジ）で解析
- ・多サンプルを一度に解析できる
- ・二次解析が比較的容易
- ・コストは割安

<憂慮すべき点>

- ・ターゲット領域外の変異情報は検出できない
- ・ターゲットする遺伝子についての既知の情報が必要

<アプリケーション>

- ・エキソームシーケンス
- ・疾患パネル

全ゲノムシーケンス

<特徴>

- ・全ゲノムを包括的に解析可能
- ・構造変異も含む様々なタイプの変異を検出できる

<憂慮すべき点>

- ・コストが割高
- ・平均カバレッジは通常30×程度
- ・データ量が多く解析が煩雑

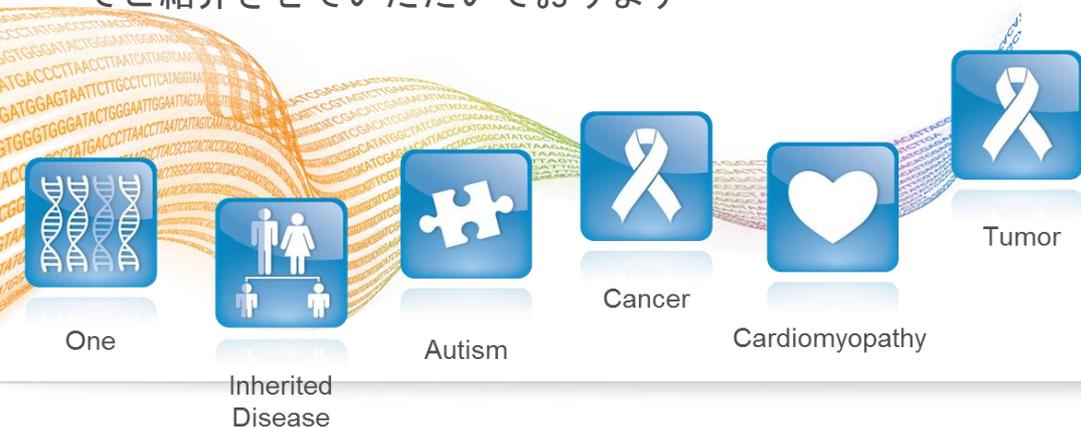
<アプリケーション>

- ・ヒトゲノムシーケンス
- ・de novoシーケンス

TruSight 疾患パネル

疾患パネル	ターゲット遺伝子	ターゲット領域	
心筋症	46	0.24 Mb	遺伝的な心筋症の原因同定にフォーカス
自閉症	101	0.33 Mb	自閉症に関連するゲノム的な特徴の解析が可能に
癌	94	0.30 Mb	癌の素因に関係する遺伝子をターゲット
遺伝性疾患	552	2.55 Mb	重篤で劣性の小児発生疾患に関する遺伝子をターゲット
Myeloid	54	0.14 Mb	骨髄性悪性腫瘍における体細胞変異の同定にフォーカス
TruSight One	4813	12 Mb	既知の臨床的表現型に関連する4813遺伝子をターゲット

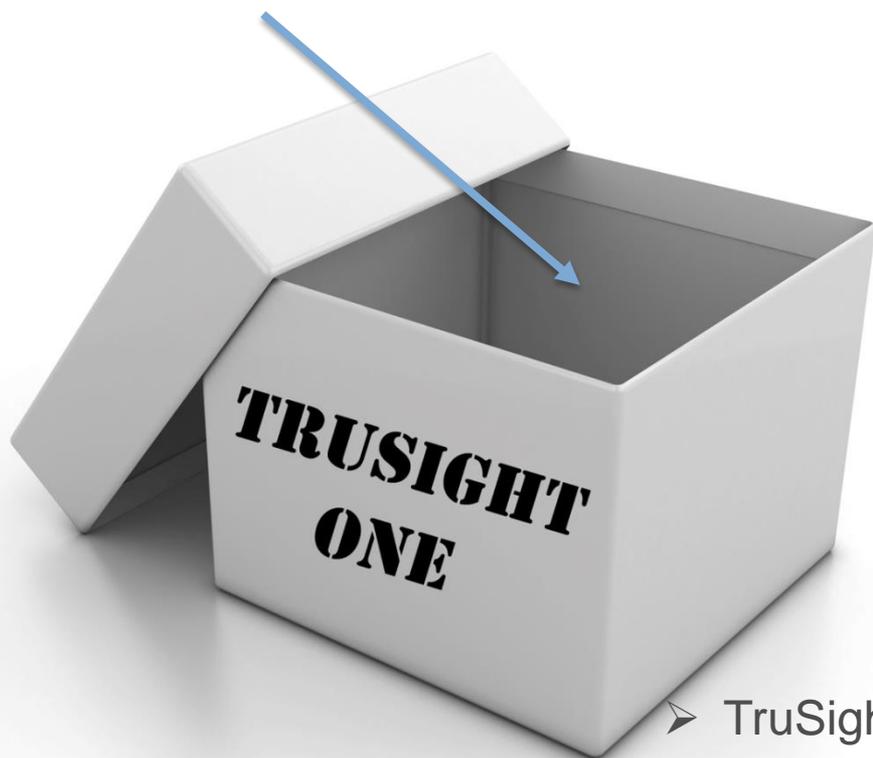
TruSight疾患パネルに関しましてはイルミナサポートウェビナー
 「TruSight疾患パネルで疾患関連遺伝子だけを効率よく低コスト解析」
 (2014/5/23)
 でご紹介させていただいております



TruSight Oneシーケンスパネル

Coding regions of

4,813 genes



TruSight Exome
(2,761 genes)

HGMD + OMIM
(1,966 genes)

GeneTests.org
(69 genes)

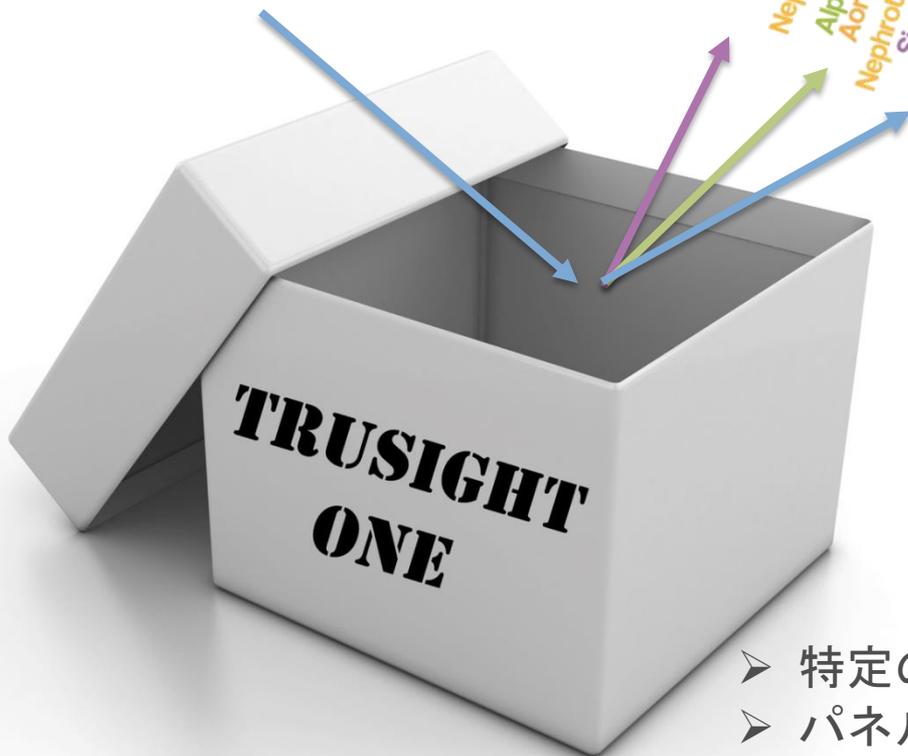
Other TruSight
(17 genes)

➤ TruSight Exomeに各種データベースの情報を追加

TruSight Oneシーケンスパネル

Coding regions of

4,813 genes



- 特定のサブセットに絞った解析も可能
- パネルごとにバリデーションを繰り返す手間を省くことができる

TruSight Oneシーケンスパネル

サンプル調製から解析までの一連の工程をサポート

BaseSpace アプリ

ライブラリ調製

シーケンス

アライメント
& 変異コール

アノテーション



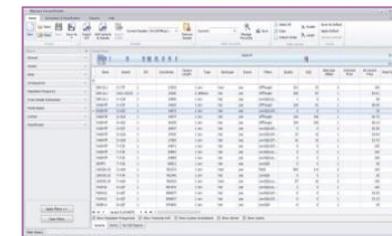
TruSight One



Enrichment



VariantStudio



ゲノムサンプル処理からのプロセスをまとめた1つのワークフローで、操作ミスの低減、コストの削減、高効率の解析を実現

TruSight Oneシーケンスパネル

サンプル調製から解析までの一連の工程をサポート

<ライブラリ調製>

- ✓ 50 ng DNAのスタート
- ✓ DNA断片化作業を含む迅速なNexteraライブラリ調製を採用
- ✓ 1.5日以内に終了（ハンズオンタイム5時間）

<シーケンス>

- ✓ MiSeq、NextSeq、HiSeqいずれのプラットフォームにも対応
- ✓ 95%以上の領域で20x以上のカバレッジを実現

<解析>

- ✓ MiSeq Reporterまたは、BaseSpaceを用いることで変異コールまでを自動で実施
- ✓ Variant Studioを用いたアノテーション解析・レポート作成までをサポート

TruSight Oneシーケンスパネル

ご使用のシーケンサーに合わせて選べる2つのキット構成

MiSeq用Kit



TruSight One Sequencing Panel (9 Samples)

- キャプチャー用オリゴ
- 濃縮キット 3反応 - 3 サンプル/反応
- MiSeq Reagent Kits v3 (300-サイクル) x 3キット

FC-141-1006

NextSeq、HiSeq用Kit



TruSight One Sequencing Panel (36 Samples)

- キャプチャー用オリゴ
- 濃縮キット 3反応 - 12 サンプル/反応
- シーケンス試薬は含まない
(NextSeq、HiSeqの試薬と組み合わせてご使用いただける)

FC-141-1007

TruSight Oneシーケンスパネル

ご使用のシーケンサーに合わせて選べる2つのキット構成

シーケンサー	シーケンス試薬	Samples / run	Read Length
MiSeq	MiSeq Reagent Kit V3	3	150x2
NextSeq 500	NextSeq500 Mid Output	12	150x2
	NextSeq500 High Output	36	150x2
HiSeq 2500	HiSeq Rapid Run Mode (1フローセル当り)	36	150x2

**NextSeq、HiSeqでTruSight Oneシーケンスパネルを用いる場合は、別途シーケンス試薬を購入する必要があります。TruSight Oneシーケンスパネルには、VariantStudioのライセンスも含まれている。

TruSight Oneシーケンスパネルのプロトコール～ウェット編～



TruSight One シーケンス ワークフロー

Day1

ライブラリ調製



TruSight One

Day2

シーケンス +

Day3

アライメント
& 変異コール



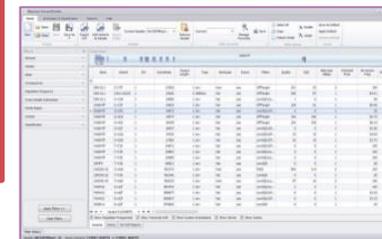
Enrichment

Day4

アノテーション



VariantStudio

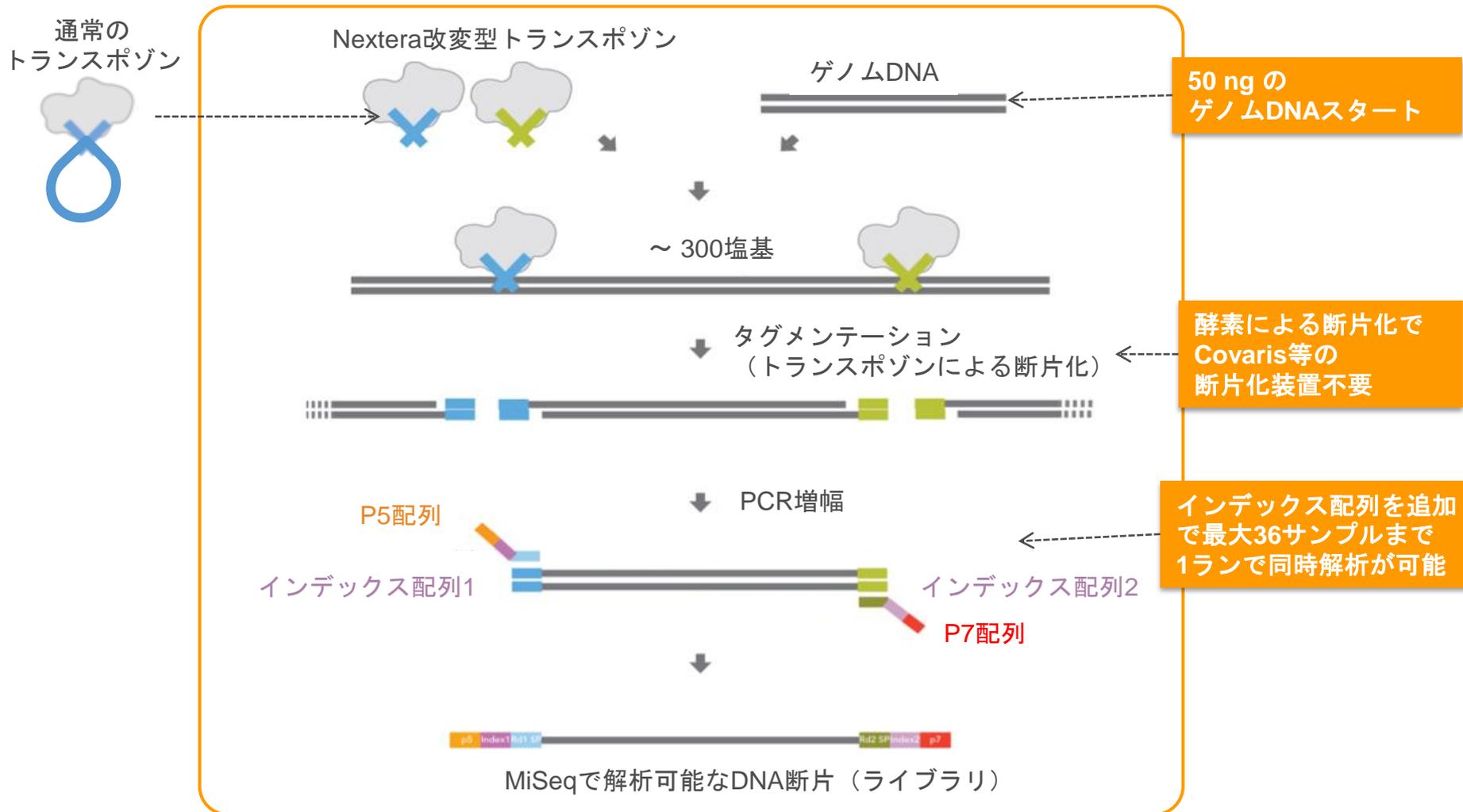


Chromosome	Position	Variant Type	Ref	Alt	Quality	Filter
1	1000000	SNP	A	G	99	PASS
1	1000001	SNP	C	T	98	PASS
1	1000002	SNP	G	A	97	PASS
1	1000003	SNP	T	C	96	PASS
1	1000004	SNP	A	G	95	PASS
1	1000005	SNP	C	T	94	PASS
1	1000006	SNP	G	A	93	PASS
1	1000007	SNP	T	C	92	PASS
1	1000008	SNP	A	G	91	PASS
1	1000009	SNP	C	T	90	PASS
1	1000010	SNP	G	A	89	PASS

TruSight Oneライブラリ調製のワークフロー

ステップ1: Nexteraライブラリステップ

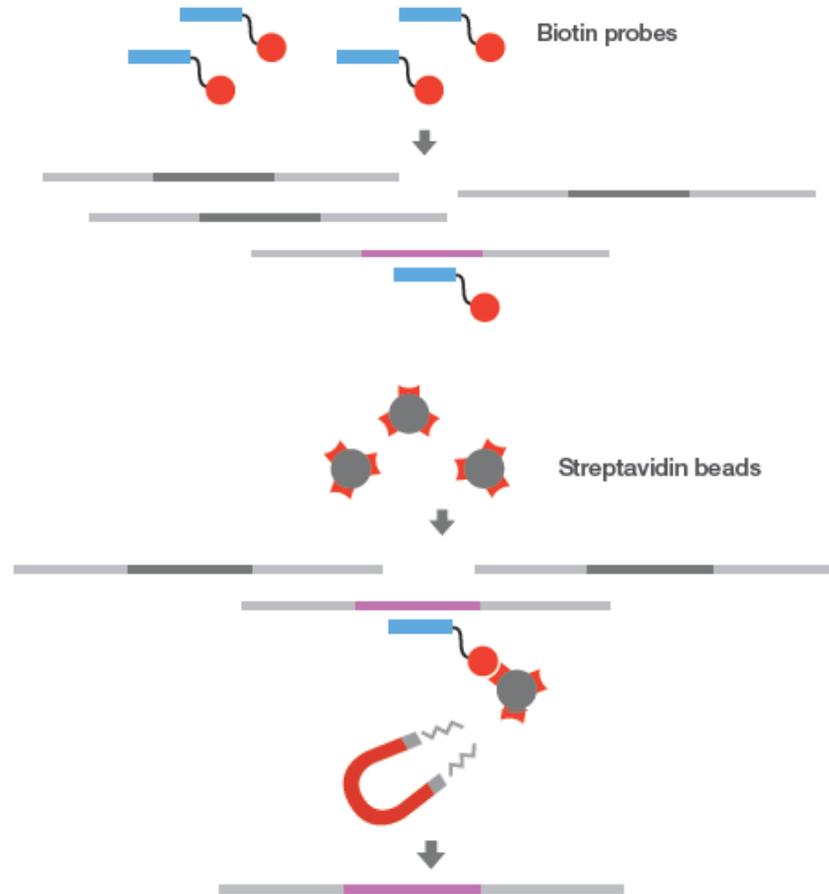
1ステップで断片化およびアダプターとインデックスの付加を実施



TruSight Oneライブラリ調製のワークフロー

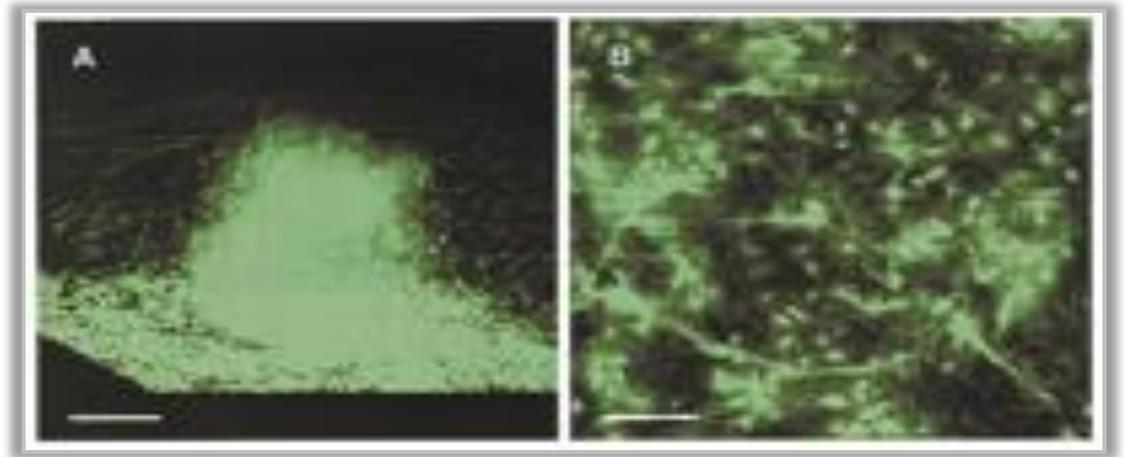
ステップ2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

ビオチン化プローブはターゲット領域のハイブリダイズした後、ストレプトアビジンビーズでキャプチャーを行う



ステップ 1: Nexteraライブラリステップ

- ▶ Input DNAは50 ngを厳守
- ▶ 二本鎖DNA特異的な手法で定量することを推奨
(Qubit、PicoGreenなど)
- ▶ $O.D._{260/280} = 1.8 - 2.0$ 程度の純度のDNAを推奨



ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation



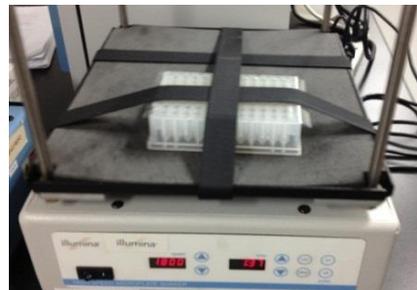
- ▶ 10 ulの5ng/ulのDNA (50 ng)を96ウェルMIDIプレートに分注し、Tagmentation反応用の試薬を各ウェルに加える (全量50 ul)

試薬	容量
5ng/ul input DNA	10 ul
Tagment DNA Buffer	25 ul
Tagment DNA Enzyme	5 ul
Water	10 ul

- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌 (ピペティング10回程度で代用可)



96 well MIDI Plate



プレートシェーカー

ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

- ▶ MIDIプレートを280xgで1分間遠心ののち、58°CのMicroheating Systemで10分間インキュベート
- ▶ 15 ulのStop Tagment Buffer (ST)をプレートの各ウェルに分注する。
- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌（ピペッティング10回程度で代用可）
- ▶ MIDIプレートを280xgで1分間遠心ののち室温で4分間インキュベート

<Best Practice>

- Stop Tagment Bufferは沈殿を生じやすいので、使用前に完全に溶解していることを確認
- Microseal 'B'はバイオラッド社の型番MSB1001をご使用いただくことを推奨
- 58°CのインキュベートのステップはMicroheating System (SciGene) の使用を推奨

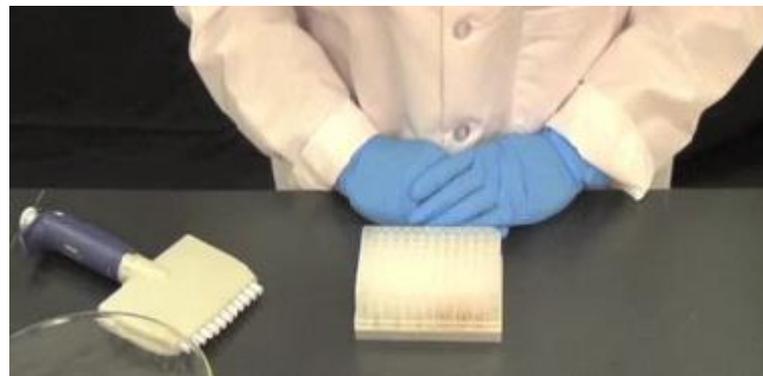


ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

Clean-up

- ▶ あらかじめよく攪拌した65 ulのSample Purification Beads (SPB) をプレートの各ウェルに分注
- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌
(ピペッティング10回程度で代用可)
- ▶ MIDIプレートを室温で8分間インキュベート
- ▶ マグネット・スタンドでビーズを集め、上清を捨て、200 ulの80%エタノールで洗浄する作業を2回繰り返す



ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

Clean-up

- ▶ MIDIプレートにマグネット・スタンド上に置いたまま室温で10分間風乾し、エタノールをとばす
- ▶ 22.5 ulのResuspension Buffer (RSB)で懸濁
- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌（ピペッティング10回程度で代用可）
- ▶ MIDIプレートを室温で2分間インキュベートのち、280xgで1分間遠心する。
- ▶ マグネット・スタンドで、2分間静置し、上清を20 ul回収し、新しい96ウェルPCRプレートに回収する

<Best Practice>

- Sample Purification Beadsは使用前に冷蔵庫から出し、室温に戻しておく
- 80%エタノールは要時調製のものをを用いる

ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

Clean-up

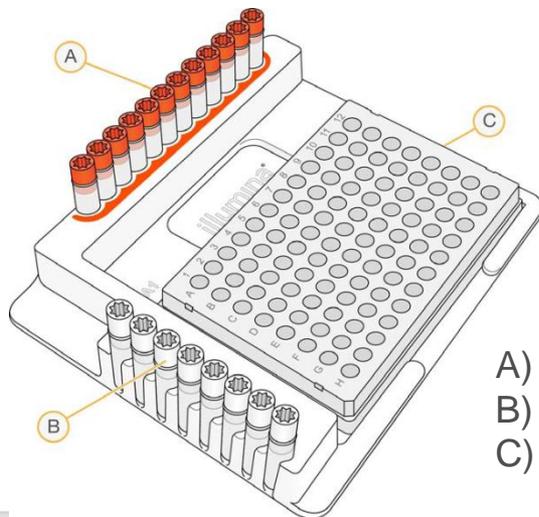
1st PCR



↓ Reduced-Cycle
PCR Amplification



- ▶ 使用するサンプルの数に合わせて、使用するインデックスの組み合わせを決めておく
(詳細はIllumina Experiment Managerの設定で紹介)
- ▶ 使用するIndex1、Index2それぞれのインデックスプライマーをTruSeq Index Plate Fixtureに配置する



- A) Index 1 Primer tubes (orange caps)
- B) Index 2 Primer tubes (white caps)
- C) NLA plate

ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

Clean-up

1st PCR

- ▶ 20 ulのサンプルDNAにPCRの試薬を加えていく

試薬	容量
Tagmented DNA	20 ul
Index1 Primer	5 ul
Index2 Primer	5 ul
Nextera Library Amplification Mix	20 ul

- ▶ 耐熱シールでプレートをしールし、プレートシェーカーで1分間攪拌（ピペティング10回程度で代用可）
- ▶ プレートを280xgで1分間遠心の後、PCR装置にプレートをセットし、下記のプログラムを実行する
 - a) ヒートリッドオプションを100°Cに設定
 - b) 72°C for 3 分間
 - c) 98°C for 30 秒間
 - d) **10 cycles** of:
 - 98°C for 10 秒間
 - 60°C for 30 秒間
 - 72°C for 30 秒間
 - e) 72°C for 5 分間
 - f) Hold at 10°C
- ▶ **Safe stopping point**
(2~8°Cで2日間まで保存可)

<Best Practice>

- インデックスプライマーのキャップは、コンタミを防ぐため、使い捨てになっている。使用後は新しいキャップでふたをする。

ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

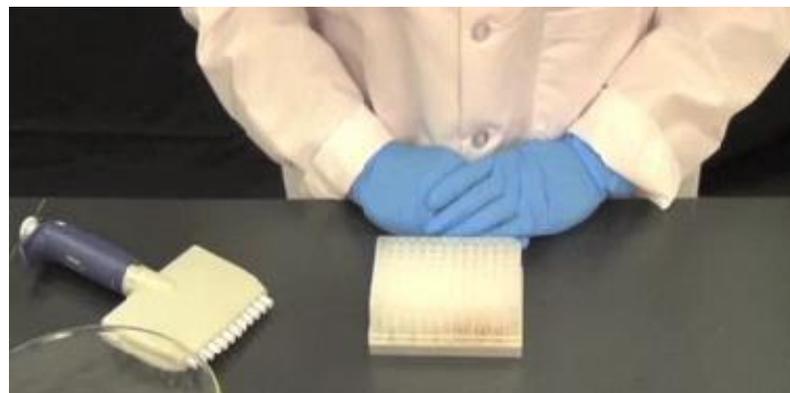
Tagmentation

Clean-up

1st PCR

1st PCR Clean Up

- ▶ PCRプレートがPCR装置より取り出し、280 xgで1分間遠心
- ▶ 50 ulのサンプル溶液をプレートより取り出し、新しい96 well MIDIプレートに移す
- ▶ よく懸濁したSample Purification Beads (SPB)を90 ulを用いて、DNAの精製を実施する（実施手順は、Clean Upのステップと同様）
- ▶ 27.5 ulのResuspension Buffer (RSB)で溶出し、上清を25 ul回収し、新しい96ウェルPCRプレートに回収する



ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

Tagmentation

Clean-up

1st PCR

1st PCR Clean Up

- ▶ 回収したサンプルのDNA濃度を、二本鎖特異的な検出が可能な蛍光定量法で測定する
- ▶ **Safe stopping point** (-15~-25°Cで14日間まで保存可)



Qubit® Fluorometric 蛍光定量
(Life technology)

Image from

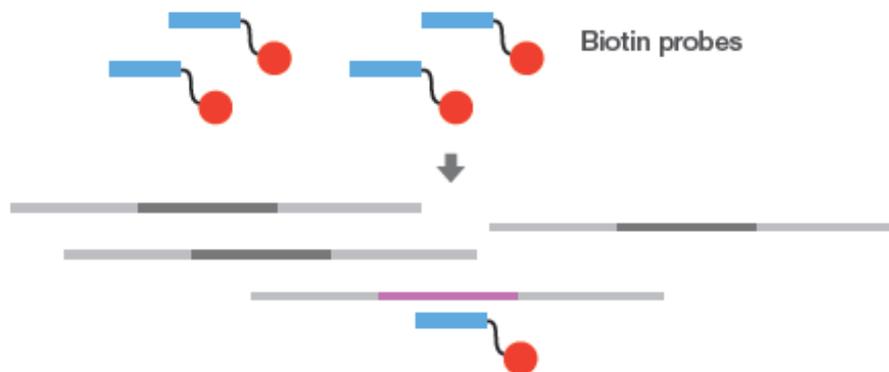
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/Q33217>

<Best Practice>

- サンプルの正確な濃度定量が、次の濃縮ステップの成功のキーポイント、蛍光定量は必ず実施する

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization



- ▶ 各サンプル500 ngずつを、PCRプレートにプーリングしていく。

Table 1 DNA Libraries for Enrichment

Library Pool Complexity	Total DNA Library Mass (ng)
1-plex	500
2-plex	1000
3-plex	1500
4-plex	2000
5-plex	2500
6-plex	3000
7-plex	3500
8-plex	4000
9-plex	4500
10-plex	5000
11-plex	5500
12-plex	6000

9 Sample TruSight One Kit
(MiSeq用)

36 Sample TruSight One Kit
(HiSeq、NextSeq用)

9 sample TruSight One Kitは3サンプルまで、
36 sample TruSight One Kitは12サンプルま
でのプーリングに対応

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

- ▶ Resuspension Buffer (RSB)を全量が40 ulになるように加える
(全量が40 ulを超えてしまっている場合は、遠心式濃縮機や限外濾過法を用いて濃縮する)

- ▶ あらかじめ溶解し、混和したHybridization試薬を下記のように各ウェルに加える

Reagent	Volume (μl)
DNA library sample or library pool from NLS plate	40
Enrichment Hybridization Buffer	50
TruSight One Oligos	10
Total Volume per Sample	100

- ▶ PCRプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌
(ピペティング10回程度で代用可)
- ▶ PCRプレートをPCR装置にセットし、下記のプログラムを実行
 - a) ヒートリッドオプションを100°Cに設定
 - b) 95°C for 10 分間
 - c) 94°Cから、58°Cまで 1分間に2°Cずつ下げる
 - d) 58°Cで90分以上、最長で24時間インキュベート

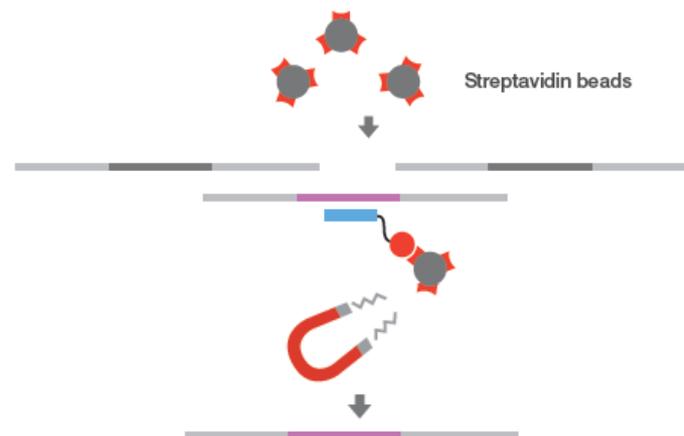
<Best Practice>

- 次のステップ (First Capture) に進む準備ができるまでは、プレートは58°Cに置いたままにする。

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

1st Capture



- ▶ PCR プレートがPCR装置より回収ののち、280 xgで1分間遠心する
- ▶ サンプル溶液全量を90 well MIDIプレートに移す
- ▶ よく懸濁したStreptavidin Magnetic Beadsを各ウェルに250 ulずつ加える
- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌（ピペティング10回程度で代用可）
- ▶ MIDIプレートを25分間室温で静置する
- ▶ MIDIプレートをマグネット・スタンドに置き、2分間、室温で静置する
- ▶ Beadsを吸い込まないように注意しながら、ピペットで上清を取り除く
- ▶ マグネット・スタンドからプレートを外す

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

1st Capture

- ▶ あらかじめ溶解、混和したEnrichment Wash Solutionを200 ulずつ各ウェルに加える
- ▶ Beadがペレット状でなくなるまで、ピペティングし、さらにその後、10回ピペティングを繰り返す
- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールする
- ▶ あらかじめ50°CにしておいたMicroheating Systemで、50°C、30分間インキュベートする
- ▶ ただちにMIDIプレートをマグネット・スタンドに移し、2分間静置
- ▶ ただちに上清を取り除く
- ▶ Enrichment Wash Solutionを200 ulずつ加え、上記のwashの操作を繰り返す

<Best Practice>

- このステップではMicroheating System (SciGene) を使用することが望ましい
ただし、PCR装置でも代用可



ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

1st Capture

- ▶ 1.5 mlマイクロチューブに溶出用の試薬のプレミックスを下記のように用意し、23.5 ulずつをMIDIプレートの各ウェルに分注する

Reagent	Volume (μl)
Enrichment Elution Buffer 1	28.5
HP3 (2 N NaOH)	1.5
Total Volume per Sample	30

- ▶ MIDIプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで2分間攪拌
(ピペティング10回程度で代用可)
- ▶ MIDIプレートを室温で2分間静置の後、280xgで1分間遠心する
- ▶ MIDIプレートをマグネット・スタンドで2分間静置の後、21 ulの上清を回収し、新しいPCRプレートに移す
- ▶ 4 ulのElute Target Bufferを各ウェルに加えて、中和する
- ▶ PCRプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌
(ピペティング10回程度で代用可)
- ▶ PCRプレートを室温で2分間静置の後、280xgで1分間遠心する
- ▶ **Safe stopping point** (-15°C~-25°Cで7日間まで保存可)

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

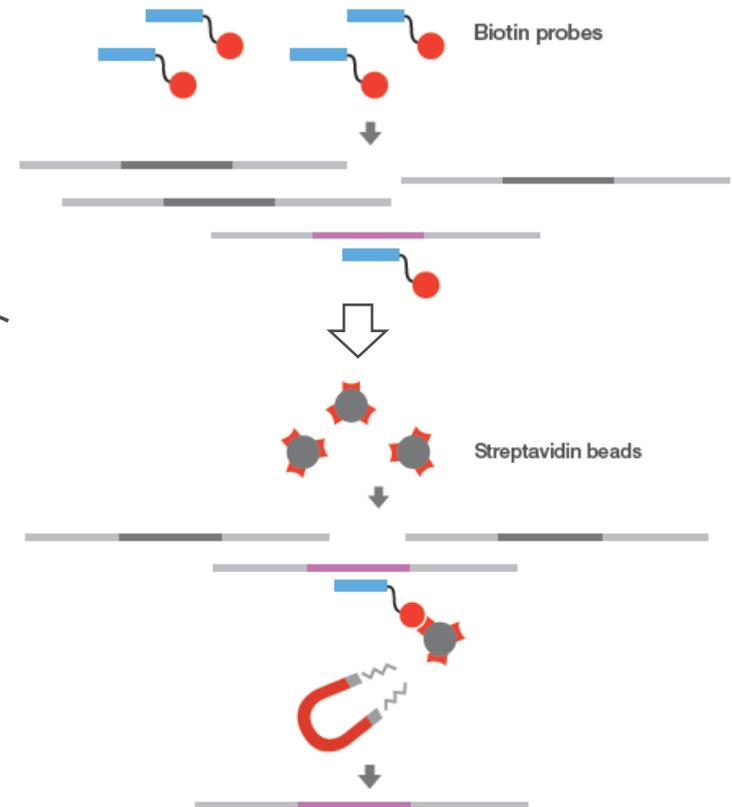
1st Hybridization

1st Capture

2nd Hybri&Capture

- ▶ 1st Hybridizationと1st Captureのステップを繰り返し実施、ただしHybridization Stepインキュベーション時間が異なる

- ヒートリッドオプションを100°Cに設定
- 95°C for 10 分間
- 94°Cから、58°Cまで 1分間に2°Cずつ下げる
- 58°Cで**14.5時間**以上、最長で24時間インキュベート



ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

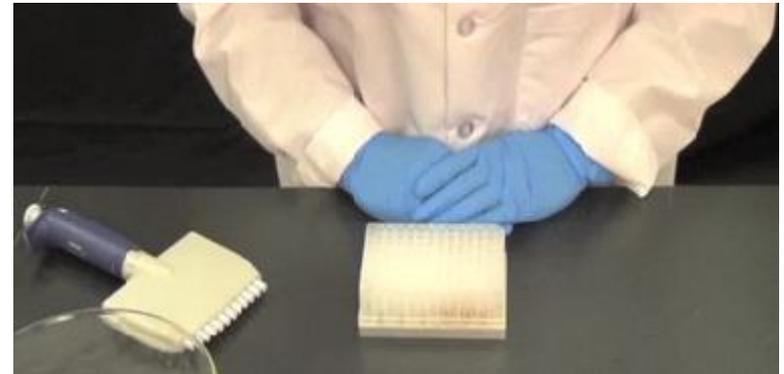
1st Hybridization

1st Capture

2nd Hybri&Capture

Sample Clean Up

- ▶ よく懸濁したSample Purification Beads (SPB)を45 ulを用いて、DNAの精製を実施する（実施手順は、Nextera Library StepのPCR Clean Upと同様）
- ▶ 27.5 ulのResuspension Buffer (RSB)で溶出し、上清を25 ul回収し、新しい96ウェルPCRプレートに回収する
- ▶ **Safe stopping point**（-15~-25°Cで7日間まで保存可）



ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

1st Capture

2nd Hybri&Capture

Sample Clean Up

2nd PCR

- ▶ PCR用試薬サンプルDNAの入ったPCRプレートの各ウェルに加える（全量50 ul）

試薬	容量
Captured DNA	25 ul
PCR Primer Cocktail	5 ul
Nextera Enrichment Amplification Mix	20 ul

- ▶ PCRプレートをMicroseal 'B'でシールし、プレートシェーカーで1分間攪拌（ピペティング10回程度で代用可）
- ▶ 280xgで1分間遠心する。
- ▶ PCR装置にPCRプレートを設置し、下記のプログラムを実行

- ヒートリッドオプションを100°Cに設定
- 72°C for 3 分間
- 98°C for 30 秒間
- 10 cycles** of:
 - 98°C for 10 秒間
 - 60°C for 30 秒間
 - 72°C for 30 秒間
- 72°C for 5 分間
- Hold at 10°C



<Best Practice>

- Nextera Enrichment Amplification MixとPCR Primer Cocktailは凍結融解を繰り返さないために、小分けにして冷凍保存することを推奨
- このステップでのPCRのサイクル条件は変更しない

ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

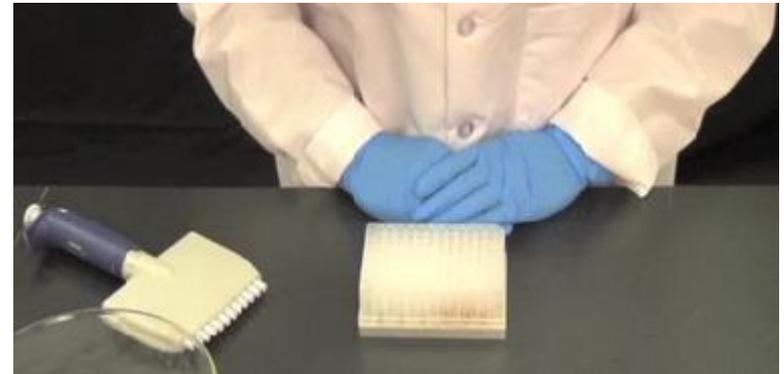
1st Capture

2nd Hybri&Capture

Sample Clean Up

2nd PCR

- ▶ サンプル全量 (50 ul) をMIDIプレートに移す
- ▶ よく懸濁したSample Purification Beads (SPB)を90 ulを用いて、DNAの精製を実施する (実施手順は、Nextera Library StepのPCR Clean Upと同様)
- ▶ 32.5 ulのResuspension Buffer (RSB)で溶出し、上清を30 ul回収し、新しい96ウェルPCRプレートに回収する
- ▶ **Safe stopping point** (-15~-25°Cで7日間まで保存可)



ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1st Hybridization

1st Capture

2nd Hybri&Capture

Sample Clean Up

2nd PCR

- ▶ 回収したサンプルのDNA濃度を、二本鎖特異的な検出が可能な蛍光定量法で測定する
- ▶ 650 bp換算で、濃度を計算する

例)

$$\frac{15 \text{ ng/ul}}{(660\text{g/mol} \times 650\text{bp})} \times 10^6 = 34.9 \text{ nM}$$

- ▶ qPCRでの測定も可能

Sequencing Library qPCR Quantification Guide

<http://support.illumina.com/sequencing/kits.html>

<Best Practice>

- 正確な定量が、適正なクラスター密度を得るために重要、二本鎖特異的な定量方法を必ずご実施ください



Qubit® Fluorometric 蛍光定量
(Life technology)

Image from

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/Q33217>



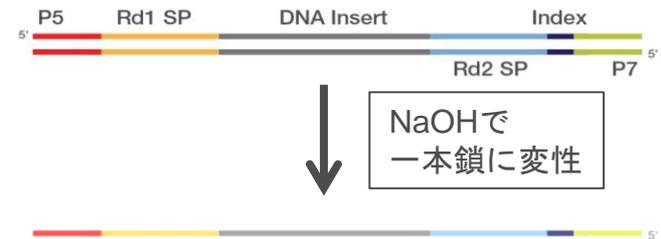
KAPA NGSライブラリ調製キット
(Nihon Genetics)

[http://www.n-](http://www.n-genetics.com/product_detail.html?item_id=4484)

[genetics.com/product_detail.html?item_id=4484](http://www.n-genetics.com/product_detail.html?item_id=4484)

ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

Denature DNA



- ▶ ライブラリーをResuspension Bufferで、1.25 nMに希釈する
- ▶ 1.5 mlマイクロチューブに10 ulの1.25 nMライブラリと10 ulの0.1N NaOHを混和し、5分間インキュベート
- ▶ 980 ulのHT1 Bufferを加えて、ライブラリを希釈・中和（終濃度12.5 pM）
- ▶ マイクロチューブを氷上に置いておく

<Best Practice>

- 0.1 N NaOHは要時調製し、pH13以上のものを使用していただく



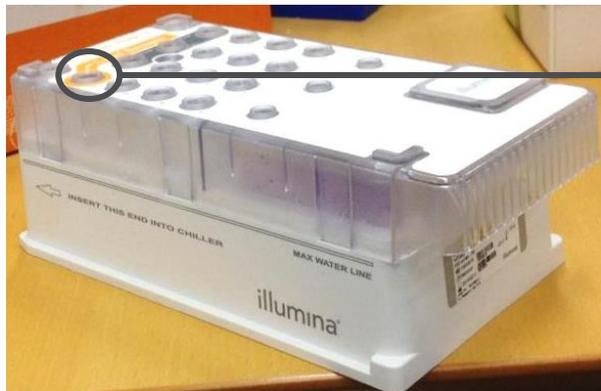
Hyb Bufferチューブ (HT1)
MiSeq試薬に付属

ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

Denature DNA

Sample Loading

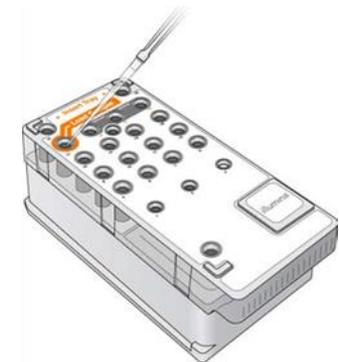
- ▶ MiSeq試薬カートリッジを冷凍庫から取り出して、溶解（水浴での溶解も可）
- ▶ 「Load Sample」（17番）のポジションに、希釈・変性済みのDNAライブラリーを600 ulロードする



MiSeq試薬カートリッジ



この部分に希釈済みのライブラリ溶液600 ulを移す



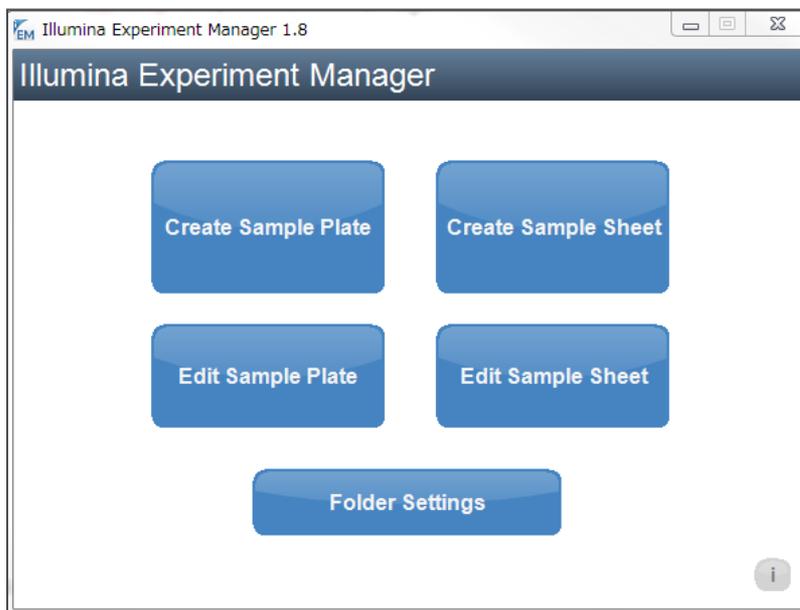
ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

- ▶ MiSeqのランの実施には、サンプルシートというランの条件を設定したcsvファイルが必要
- ▶ Illumina Experiment Managerで作成する



Sample Sheet例

```
[Header]
IEMFileVersion          4
Investigator Name      Me
Experiment Name         My Experiment
Date                   2/13/2013
Workflow               Enrichment
Application             Enrichment
Assay                  TruSight Enrichment
Description             Myself
Chemistry               Default

[Manifests]
A                      TruSight_Cancer_Manifest_A.txt

[Reads]
                      151
                      151

[Settings]
IndelRealignment       GATK
FlagPCRDuplicates      FALSE
VariantFilterQualityCutoff 30
Adapter                CTGTCTCTATACACATCT
ExcludeRegionsManifestA BRCA2+BRCA1+FNCC

[Data]
Sample_ID      Sample_Name  Sample_Plate  Sample_Well  I7_Index_ID  index  Sample_Project  Description  Manifest  GenomeFolder
Enrich1       Patient1    EnrichPlate  A1           N701         TAAGGCCGA  MyProject      EnrichProject A  C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFASTA
Enrich2       Patient2    EnrichPlate  A2           N702         CGTACTAG   MyProject      EnrichProject A  C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFASTA
Enrich3       Patient3    EnrichPlate  A3           N704         TCCGTGAGC  MyProject      EnrichProject A  C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFASTA
Enrich4       Patient4    EnrichPlate  A4           N706         TAGGCATG   MyProject      EnrichProject A  C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFASTA
```

ステップ 3: MiSeq ランセットアップ

Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

- ▶ TruSight Oneの実施のためには、Manifest file（TruSight Oneのターゲット領域を設定したtxt file）をご準備ください

http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit/downloads.html

```
"#Some of the genomic variants, genes, nucleic acid sequences, or genomic regions on this list, and their use in spe
[Header]
ReferenceGenome C:%Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFASTA
[Regions]
Name Chromosome Amplicon Start Amplicon End Upstream Probe Length Downstream Probe Length
AGRN.chr1.955552.955753 chr1 955542 955763 0 0
AGRN.chr1.957580.957842 chr1 957570 957852 0 0
AGRN.chr1.970656.970704 chr1 970646 970714 0 0
AGRN.chr1.976044.976260 chr1 976034 976270 0 0
AGRN.chr1.976552.976777 chr1 976542 976787 0 0
AGRN.chr1.976857.977082 chr1 976847 977092 0 0
AGRN.chr1.977335.977542 chr1 977325 977552 0 0
AGRN.chr1.978618.978837 chr1 978608 978847 0 0
AGRN.chr1.978917.979112 chr1 978907 979122 0 0
AGRN.chr1.979202.979403 chr1 979192 979413 0 0
AGRN.chr1.979488.979637 chr1 979478 979647 0 0
AGRN.chr1.979713.979819 chr1 979703 979829 0 0
AGRN.chr1.980540.980657 chr1 980530 980667 0 0
AGRN.chr1.980738.980903 chr1 980728 980913 0 0
AGRN.chr1.981112.981256 chr1 981102 981266 0 0
AGRN.chr1.981343.981468 chr1 981333 981478 0 0
AGRN.chr1.981539.981645 chr1 981529 981655 0 0
AGRN.chr1.981776.982115 chr1 981766 982125 0 0
AGRN.chr1.982199.982337 chr1 982189 982347 0 0
AGRN.chr1.982706.982834 chr1 982696 982844 0 0
AGRN.chr1.982952.983067 chr1 982942 983077 0 0
AGRN.chr1.983155.983275 chr1 983145 983285 0 0
AGRN.chr1.983391.983745 chr1 983381 983755 0 0
AGRN.chr1.984246.984439 chr1 984236 984449 0 0
AGRN.chr1.984615.984831 chr1 984605 984841 0 0
AGRN.chr1.984945.985175 chr1 984935 985185 0 0
AGRN.chr1.985208.985412 chr1 985198 985408 0 0
AGRN.chr1.985645.985857 chr1 985635 985847 0 0
AGRN.chr1.986288.986500 chr1 986278 986490 0 0
AGRN.chr1.986931.987143 chr1 986921 987133 0 0
AGRN.chr1.987574.987786 chr1 987564 987776 0 0
AGRN.chr1.988217.988429 chr1 988207 988417 0 0
AGRN.chr1.988860.989072 chr1 988850 989060 0 0
AGRN.chr1.989503.989715 chr1 989493 989703 0 0
AGRN.chr1.990146.990358 chr1 990136 990346 0 0
AGRN.chr1.990789.991001 chr1 990779 991089 0 0
AGRN.chr1.991432.991644 chr1 991422 991634 0 0
AGRN.chr1.992075.992287 chr1 992065 992275 0 0
AGRN.chr1.992718.992930 chr1 992708 992918 0 0
AGRN.chr1.993361.993573 chr1 993351 993561 0 0
AGRN.chr1.994004.994216 chr1 993994 994204 0 0
AGRN.chr1.994647.994859 chr1 994637 994847 0 0
AGRN.chr1.995290.995502 chr1 995280 995490 0 0
AGRN.chr1.995933.996145 chr1 995923 996133 0 0
AGRN.chr1.996576.996788 chr1 996566 996776 0 0
AGRN.chr1.997219.997431 chr1 997209 997419 0 0
AGRN.chr1.997862.998074 chr1 997852 998062 0 0
AGRN.chr1.998505.998717 chr1 998495 998705 0 0
AGRN.chr1.999148.999360 chr1 999138 999348 0 0
AGRN.chr1.999791.999999 chr1 999781 999989 0 0
AGRN.chr1.1000432.1000644 chr1 1000422 1000632 0 0
AGRN.chr1.1000975.1001187 chr1 1000965 1001175 0 0
AGRN.chr1.1001518.1001730 chr1 1001508 1001718 0 0
AGRN.chr1.1002061.1002273 chr1 1002051 1002261 0 0
AGRN.chr1.1002604.1002816 chr1 1002594 1002804 0 0
AGRN.chr1.1003147.1003359 chr1 1003137 1003347 0 0
AGRN.chr1.1003690.1003902 chr1 1003680 1003890 0 0
AGRN.chr1.1004233.1004445 chr1 1004223 1004433 0 0
AGRN.chr1.1004776.1004988 chr1 1004766 1004976 0 0
AGRN.chr1.1005319.1005531 chr1 1005309 1005519 0 0
AGRN.chr1.1005862.1006074 chr1 1005852 1006062 0 0
AGRN.chr1.1006405.1006617 chr1 1006395 1006605 0 0
AGRN.chr1.1006948.1007160 chr1 1006938 1007148 0 0
AGRN.chr1.1007491.1007703 chr1 1007481 1007691 0 0
AGRN.chr1.1008034.1008246 chr1 1008024 1008234 0 0
AGRN.chr1.1008577.1008789 chr1 1008567 1008777 0 0
AGRN.chr1.1009120.1009332 chr1 1009110 1009320 0 0
AGRN.chr1.1009663.1009875 chr1 1009653 1009863 0 0
AGRN.chr1.1010206.1010418 chr1 1010196 1010406 0 0
AGRN.chr1.1010749.1010961 chr1 1010739 1010949 0 0
AGRN.chr1.1011292.1011504 chr1 1011282 1011492 0 0
AGRN.chr1.1011835.1012047 chr1 1011825 1012035 0 0
AGRN.chr1.1012378.1012590 chr1 1012368 1012578 0 0
AGRN.chr1.1012921.1013133 chr1 1012911 1013121 0 0
AGRN.chr1.1013464.1013676 chr1 1013454 1013664 0 0
AGRN.chr1.1014007.1014219 chr1 1013997 1014207 0 0
AGRN.chr1.1014550.1014762 chr1 1014540 1014750 0 0
AGRN.chr1.1015093.1015305 chr1 1015083 1015293 0 0
AGRN.chr1.1015636.1015848 chr1 1015626 1015836 0 0
AGRN.chr1.1016179.1016391 chr1 1016169 1016379 0 0
AGRN.chr1.1016722.1016934 chr1 1016712 1016922 0 0
AGRN.chr1.1017265.1017477 chr1 1017255 1017465 0 0
AGRN.chr1.1017808.1018020 chr1 1017798 1018008 0 0
AGRN.chr1.1018351.1018563 chr1 1018341 1018551 0 0
AGRN.chr1.1018894.1019106 chr1 1018884 1019094 0 0
AGRN.chr1.1019437.1019649 chr1 1019427 1019637 0 0
AGRN.chr1.1020080.1020292 chr1 1020070 1020280 0 0
AGRN.chr1.1020623.1020835 chr1 1020613 1020823 0 0
AGRN.chr1.1021166.1021378 chr1 1021156 1021366 0 0
AGRN.chr1.1021709.1021921 chr1 1021699 1021909 0 0
AGRN.chr1.1022252.1022464 chr1 1022242 1022452 0 0
AGRN.chr1.1022795.1023007 chr1 1022785 1022995 0 0
AGRN.chr1.1023338.1023550 chr1 1023328 1023538 0 0
AGRN.chr1.1023881.1024093 chr1 1023871 1024081 0 0
AGRN.chr1.1024424.1024636 chr1 1024414 1024624 0 0
AGRN.chr1.1024967.1025179 chr1 1024957 1025167 0 0
AGRN.chr1.1025510.1025722 chr1 1025500 1025710 0 0
AGRN.chr1.1026053.1026265 chr1 1026043 1026253 0 0
AGRN.chr1.1026596.1026808 chr1 1026586 1026796 0 0
AGRN.chr1.1027139.1027351 chr1 1027129 1027339 0 0
AGRN.chr1.1027682.1027894 chr1 1027672 1027882 0 0
AGRN.chr1.1028225.1028437 chr1 1028215 1028425 0 0
AGRN.chr1.1028768.1028980 chr1 1028758 1028968 0 0
AGRN.chr1.1029311.1029523 chr1 1029301 1029511 0 0
AGRN.chr1.1029854.1030066 chr1 1029844 1030054 0 0
AGRN.chr1.1030397.1030609 chr1 1030387 1030597 0 0
AGRN.chr1.1030940.1031152 chr1 1030930 1031140 0 0
AGRN.chr1.1031483.1031695 chr1 1031473 1031683 0 0
AGRN.chr1.1032026.1032238 chr1 1032016 1032226 0 0
AGRN.chr1.1032569.1032781 chr1 1032559 1032769 0 0
AGRN.chr1.1033112.1033324 chr1 1033102 1033312 0 0
AGRN.chr1.1033655.1033867 chr1 1033645 1033855 0 0
AGRN.chr1.1034198.1034410 chr1 1034188 1034398 0 0
AGRN.chr1.1034741.1034953 chr1 1034731 1034941 0 0
AGRN.chr1.1035284.1035496 chr1 1035274 1035484 0 0
AGRN.chr1.1035827.1036039 chr1 1035817 1036027 0 0
AGRN.chr1.1036370.1036582 chr1 1036360 1036570 0 0
AGRN.chr1.1036913.1037125 chr1 1036903 1037113 0 0
AGRN.chr1.1037456.1037668 chr1 1037446 1037656 0 0
AGRN.chr1.1038099.1038311 chr1 1038089 1038299 0 0
AGRN.chr1.1038642.1038854 chr1 1038632 1038842 0 0
AGRN.chr1.1039185.1039397 chr1 1039175 1039385 0 0
AGRN.chr1.1039728.1040140 chr1 1039718 1040130 0 0
AGRN.chr1.1040271.1040683 chr1 1040261 1040673 0 0
AGRN.chr1.1040814.1041226 chr1 1040804 1041216 0 0
AGRN.chr1.1041357.1041769 chr1 1041347 1041759 0 0
AGRN.chr1.1041900.1042312 chr1 1041890 1042302 0 0
AGRN.chr1.1042443.1042855 chr1 1042433 1042845 0 0
AGRN.chr1.1042986.1043398 chr1 1042976 1043388 0 0
AGRN.chr1.1043529.1043941 chr1 1043519 1043931 0 0
AGRN.chr1.1044072.1044484 chr1 1044062 1044474 0 0
AGRN.chr1.1044615.1045027 chr1 1044605 1045017 0 0
AGRN.chr1.1045158.1045570 chr1 1045148 1045560 0 0
AGRN.chr1.1045701.1046113 chr1 1045691 1046103 0 0
AGRN.chr1.1046244.1046656 chr1 1046234 1046646 0 0
AGRN.chr1.1046787.1047199 chr1 1046777 1047189 0 0
AGRN.chr1.1047330.1047742 chr1 1047320 1047732 0 0
AGRN.chr1.1047873.1048285 chr1 1047863 1048275 0 0
AGRN.chr1.1048416.1048828 chr1 1048406 1048818 0 0
AGRN.chr1.1048959.1049371 chr1 1048949 1049361 0 0
AGRN.chr1.1049502.1049914 chr1 1049492 1049904 0 0
AGRN.chr1.1050045.1050457 chr1 1050035 1050447 0 0
AGRN.chr1.1050588.1051000 chr1 1050578 1051090 0 0
AGRN.chr1.1051131.1051543 chr1 1051121 1051533 0 0
AGRN.chr1.1051674.1052086 chr1 1051664 1052076 0 0
AGRN.chr1.1052217.1052629 chr1 1052207 1052619 0 0
AGRN.chr1.1052760.1053172 chr1 1052750 1053162 0 0
AGRN.chr1.1053303.1053715 chr1 1053293 1053705 0 0
AGRN.chr1.1053846.1054258 chr1 1053836 1054248 0 0
AGRN.chr1.1054389.1054801 chr1 1054379 1054791 0 0
AGRN.chr1.1054932.1055344 chr1 1054922 1055334 0 0
AGRN.chr1.1055475.1055887 chr1 1055465 1055877 0 0
AGRN.chr1.1056018.1056430 chr1 1056008 1056420 0 0
AGRN.chr1.1056561.1056973 chr1 1056551 1056963 0 0
AGRN.chr1.1057104.1057516 chr1 1057094 1057506 0 0
AGRN.chr1.1057647.1058059 chr1 1057637 1058049 0 0
AGRN.chr1.1058190.1058602 chr1 1058180 1058594 0 0
AGRN.chr1.1058733.1059145 chr1 1058723 1059137 0 0
AGRN.chr1.1059276.1059688 chr1 1059266 1059680 0 0
AGRN.chr1.1059819.1060231 chr1 1059809 1060223 0 0
AGRN.chr1.1060362.1060774 chr1 1060352 1060766 0 0
AGRN.chr1.1060905.1061317 chr1 1060895 1061309 0 0
AGRN.chr1.1061448.1061860 chr1 1061438 1061852 0 0
AGRN.chr1.1061991.1062403 chr1 1061981 1062395 0 0
AGRN.chr1.1062534.1062946 chr1 1062524 1062938 0 0
AGRN.chr1.1063077.1063489 chr1 1063067 1063481 0 0
AGRN.chr1.1063620.1064032 chr1 1063610 1064024 0 0
AGRN.chr1.1064163.1064575 chr1 1064153 1064567 0 0
AGRN.chr1.1064706.1065118 chr1 1064696 1065110 0 0
AGRN.chr1.1065249.1065661 chr1 1065239 1065653 0 0
AGRN.chr1.1065792.1066204 chr1 1065782 1066196 0 0
AGRN.chr1.1066335.1066747 chr1 1066325 1066739 0 0
AGRN.chr1.1066878.1067290 chr1 1066868 1067283 0 0
AGRN.chr1.1067421.1067833 chr1 1067411 1067827 0 0
AGRN.chr1.1067964.1068376 chr1 1067954 1068372 0 0
AGRN.chr1.1068507.1068919 chr1 1068497 1068915 0 0
AGRN.chr1.1069050.1069462 chr1 1069040 1069470 0 0
AGRN.chr1.1069593.1070005 chr1 1069583 1070017 0 0
AGRN.chr1.1070136.1070548 chr1 1070126 1070560 0 0
AGRN.chr1.1070679.1071091 chr1 1070669 1071103 0 0
AGRN.chr1.1071222.1071634 chr1 1071212 1071646 0 0
AGRN.chr1.1071765.1072177 chr1 1071755 1072191 0 0
AGRN.chr1.1072308.1072720 chr1 1072298 1072734 0 0
AGRN.chr1.1072851.1073263 chr1 1072841 1073277 0 0
AGRN.chr1.1073394.1073806 chr1 1073384 1073820 0 0
AGRN.chr1.1073937.1074349 chr1 1073927 1074385 0 0
AGRN.chr1.1074480.1074892 chr1 1074470 1074927 0 0
AGRN.chr1.1075023.1075435 chr1 1075013 1075482 0 0
AGRN.chr1.1075566.1075978 chr1 1075556 1076027 0 0
AGRN.chr1.1076109.1076521 chr1 1076099 1076580 0 0
AGRN.chr1.1076652.1077064 chr1 1076642 1077135 0 0
AGRN.chr1.1077195.1077607 chr1 1077185 1077680 0 0
AGRN.chr1.1077738.1078150 chr1 1077728 1078225 0 0
AGRN.chr1.1078281.1078693 chr1 1078271 1078780 0 0
AGRN.chr1.1078824.1079236 chr1 1078814 1079327 0 0
AGRN.chr1.1079367.1079779 chr1 1079357 1079890 0 0
AGRN.chr1.1079910.1080322 chr1 1079900 1080435 0 0
AGRN.chr1.1080455.1080867 chr1 1080445 1080980 0 0
AGRN.chr1.1081008.1081420 chr1 1080998 1081535 0 0
AGRN.chr1.1081551.1081963 chr1 1081541 1082090 0 0
AGRN.chr1.1082094.1082506 chr1 1082084 1082655 0 0
AGRN.chr1.1082637.1083049 chr1 1082627 1083210 0 0
AGRN.chr1.1083180.1083592 chr1 1083170 1083753 0 0
AGRN.chr1.1083723.1084135 chr1 1083713 1084306 0 0
AGRN.chr1.1084266.1084678 chr1 1084256 1084860 0 0
AGRN.chr1.1084809.1085221 chr1 1084799 1085403 0 0
AGRN.chr1.1085352.1085764 chr1 1085342 1085958 0 0
AGRN.chr1.1085895.1086307 chr1 1085885 1086512 0 0
AGRN.chr1.1086438.1086850 chr1 1086428 1087065 0 0
AGRN.chr1.1086981.1087393 chr1 1086971 1087620 0 0
AGRN.chr1.1087524.1087936 chr1 1087514 1088205 0 0
AGRN.chr1.1088067.1088479 chr1 1088057 1088750 0 0
AGRN.chr1.1088610.1089022 chr1 1088600 1089305 0 0
AGRN.chr1.1089153.1089565 chr1 1089143 1089840 0 0
AGRN.chr1.1089696.1090108 chr1 1089686 1090395 0 0
AGRN.chr1.1090239.1090651 chr1 1090229 1091020 0 0
AGRN.chr1.1090782.1091194 chr1 1090772 1091575 0 0
AGRN.chr1.1091325.1091737 chr1 1091315 1091830 0 0
AGRN.chr1.1091868.1092280 chr1 1091858 1092485 0 0
AGRN.chr1.1092411.1092823 chr1 1092401 1093030 0 0
AGRN.chr1.1092954.1093366 chr1 1092944 1093585 0 0
AGRN.chr1.1093497.1093909 chr1 1093487 1094140 0 0
AGRN.chr1.1094040.1094452 chr1 1094030 1094715 0 0
AGRN.chr1.1094583.1094995 chr1 1094573 1095290 0 0
AGRN.chr1.1095126.1095538 chr1 1095116 1095865 0 0
AGRN.chr1.1095669.1096081 chr1 1095659 1096440 0 0
AGRN.chr1.1096212.1096624 chr1 1096202 1096995 0 0
AGRN.chr1.1096755.1097167 chr1 1096745 1097540 0 0
AGRN.chr1.1097298.1097710 chr1 1097288 1098105 0 0
AGRN.chr1.1097841.1098253 chr1 1097831 1098690 0 0
AGRN.chr1.1098384.1098796 chr1 1098374 1099055 0 0
AGRN.chr1.1098927.1099339 chr1 1098917 1099780 0 0
AGRN.chr1.1099470.1099882 chr1 1099460 1100035 0 0
AGRN.chr1.1100013.1100425 chr1 1099993 1100550 0 0
AGRN.chr1.1100556.1100968 chr1 1100546 1101195 0 0
AGRN.chr1.1101099.1101511 chr1 1101089 1101750 0 0
AGRN.chr1.1101642.1102054 chr1 1101632 1102305 0 0
AGRN.chr1.1102185.1102597 chr1 1102175 1102860 0 0
AGRN.chr1.1102728.1103140 chr1 1102718 1103415 0 0
AGRN.chr1.1103271.1103683 chr1 1103261 1103980 0 0
AGRN.chr1.1103814.1104226 chr1 1103804 1104535 0 0
AGRN.chr1.1104357.1104769 chr1 1104347 1105090 0 0
AGRN.chr1.1104900.1105312 chr1 1104890 1105635 0 0
AGRN.chr1.1105443.1105855 chr1 1105433 1106190 0 0
AGRN.chr1.1105986.1106398 chr1 1105976 1106735 0 0
AGRN.chr1.1106529.1106941 chr1 1106519 1107290 0 0
AGRN.chr1.1107072.1107484 chr1 1107062 1107835 0 0
AGRN.chr1.1107615.1108027 chr1 1107605 1108400 0 0
AGRN.chr1.1108158.1108570 chr1 1108148 1108955 0 0
AGRN.chr1.1108701.1109113 chr1 1108691 1109510 0 0
AGRN.chr1.1109244.1109656 chr1 1109234 1109995 0 0
AGRN.chr1.1109787.1110199 chr1 1109777 1110630 0 0
AGRN.chr1.1110330.1110742 chr1 1110320 1111175 0 0
AGRN.chr1.1110873.1111285 chr1 1110863 1111720 0 0
AGRN.chr1.1111416.1111828 chr1 1111406 1112285 0 0
AGRN.chr1.1111959.1112371 chr1 1111949 1112840 0 0
AGRN.chr1.1112502.1112914 chr1 1112492 1113375 0 0
AGRN.chr1.1113045.1113457 chr1 1113035 1113930 0 0
AGRN.chr1.1113588.1114000 chr1 1113578 1114485 0 0
AGRN.chr1.1114131.1114543 chr1 1114121 1115030 0 0
AGRN.chr1.1114674.1115086 chr1 1114664 1115585 0 0
AGRN.chr1.1115217.1115629 chr1 1115207 1116190 0 0
AGRN.chr1.1115760.1116172 chr1 1115750 1116735 0 0
AGRN.chr1.1116303.1116715 chr1 1116293 1117300 0 0
AGRN.chr1.1116846.1117258 chr1 1116836 1117860 0 0
AGRN.chr1.1117389.1117801 chr1 1117379 1118415 0 0
AGRN.chr1.1117932.1118344 chr1 1117922 1119000 0 0
AGRN.chr1.1118475.1118887 chr1 1118465 1119555 0 0
AGRN.chr1.1119018.1119430 chr1 1119008 1120100 0 0
AGRN.chr1.1119561.1120112 chr1 1119551 1120665 0 0
AGRN.chr1.1120104.1120516 chr1 1120094 1121175 0 0
AGRN.chr1.1120647.1121059 chr1 1120637 1121730 0 0
AGRN.chr1.1121190.1121602 chr1 1121180 1122290 0 0
AGRN.chr1.1121733.1122145 chr1 1121723 1122860 0 0
AGRN.chr1.1122276.1122688 chr1 1122266 1123405 0 0
AGRN.chr1.1122819.1123231 chr1 1122809 1123950 0 0
AGRN.chr1.1123362.11
```

ステップ 3: MiSeq ランセットアップ

Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

- ▶ IEMのInstrument Selectionで「MiSeq」、MiSeq Application Selectionの画面で、Categoryに「Targeted Resequencing」 Select Applicationに「Enrichment」を選択
- ▶ Workflow Parameterでは、次のように選択

ご使用になるMiSeq試薬
カートリッジのID

Enrichment Run Settings

Reagent Cartridge Barcode MS1234567-600v3

Sample Prep Kit TruSight Enrichment

Index Reads 0 1 2

Experiment Name test

Investigator Name

Description

Date 2014/11/30

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1 151

Cycles Read 2 151

* - required field

Enrichment Workflow-Specific Settings

Use Somatic Variant Caller

Indel Realignment GATK

Flag PCR Duplicates

Run Picard HsMetrics

Variant Quality 30

Export to gVCF

Use Adapter Trimming

Cancel Back Next

1もしくは2を選択、
Index1がすべてのサンプル
でユニークな場合は、
1を選択

使用するMiSeq試薬は
151サイクルPaired endを
ランの条件として用いる

ステップ 3: MiSeq ランセットアップ

Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

- ▶ Sample Selectionでは、次のように選択

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet * - required field Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index 1 (I7)*	I7 Sequence	Index 2 (I5)*	I5 Sequence	Nextera Manifest*	Sample Project	Descrip
1				N701	TAAGGOGA	E503	TATCCTCT	TruSight-One-Manifest-		
2				N705	GGACTOCT	E503	TATCCTCT	TruSight-One-Manifest-		
3				N709	GCTACGCT	E504	AGAGTAGA	TruSight-One-Manifest-		

ユニークなサンプルID

サンプルごとのIndex情報

ドロップダウンリストから、TruSight OneのManifest fileを選択

Add Blank Row Remove Selected Rows ?

Sample Sheet Status: Valid
Reason:

Cancel Back Finish

ステップ 3: MiSeq ランセットアップ

Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

インデックスの組み合わせにご注意ください

- サイクルあたり各レーザーに対応するいずれかの塩基が必要 (green = G/T; red = A/C)
- 少数のサンプルをプーリングする場合は、Technote: Nextera Low Plex Pooling Guideを参照する

http://res.illumina.com/documents/products%5Ctechnotes%5Ctechnote_nextera_low_plex_pooling_guidelines.pdf

- 9 Sample TruSight One Kit (MiSeq用) に付属するインデックスは、いずれの組み合わせでもIEM1.5以下ではワーニングが出るが、問題はない

Good				Bad			
Index 1		Index 2		Index 1		Index 2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGGCCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGGCCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√xxxx

√=signal in both color
x=signal missing in one color channel

ステップ 3: MiSeq ランセットアップ

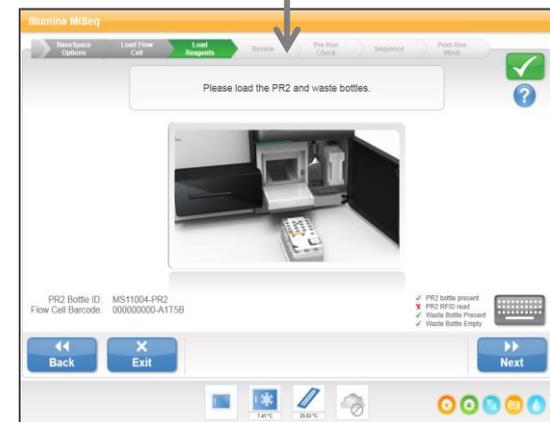
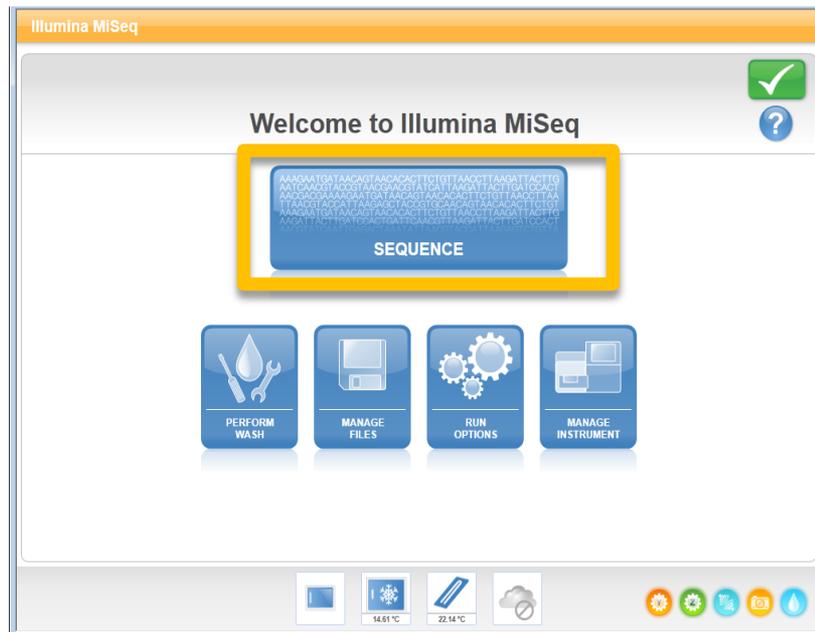
Denature DNA

Sample Loading

Sample Sheet

MiSeq run

- ▶ MiSeq Control Softwareの[Sequence]から、ランにお進みいただく
- ▶ MCSのインターフェイスに添って、操作いただければ簡単にランを開始できます



ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

Denature DNA

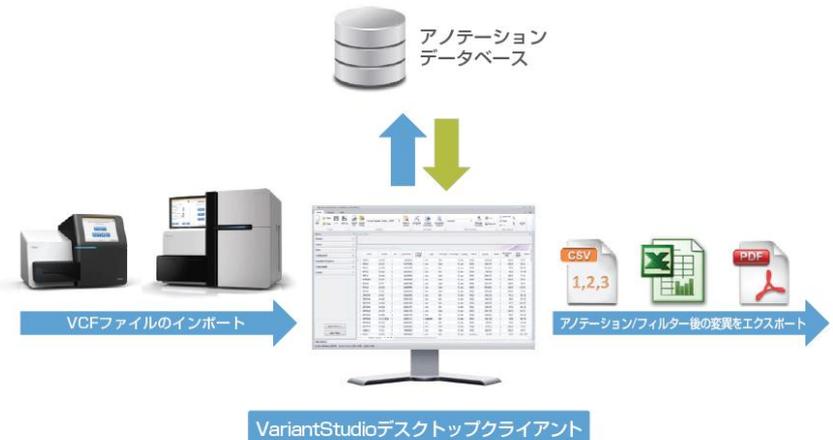
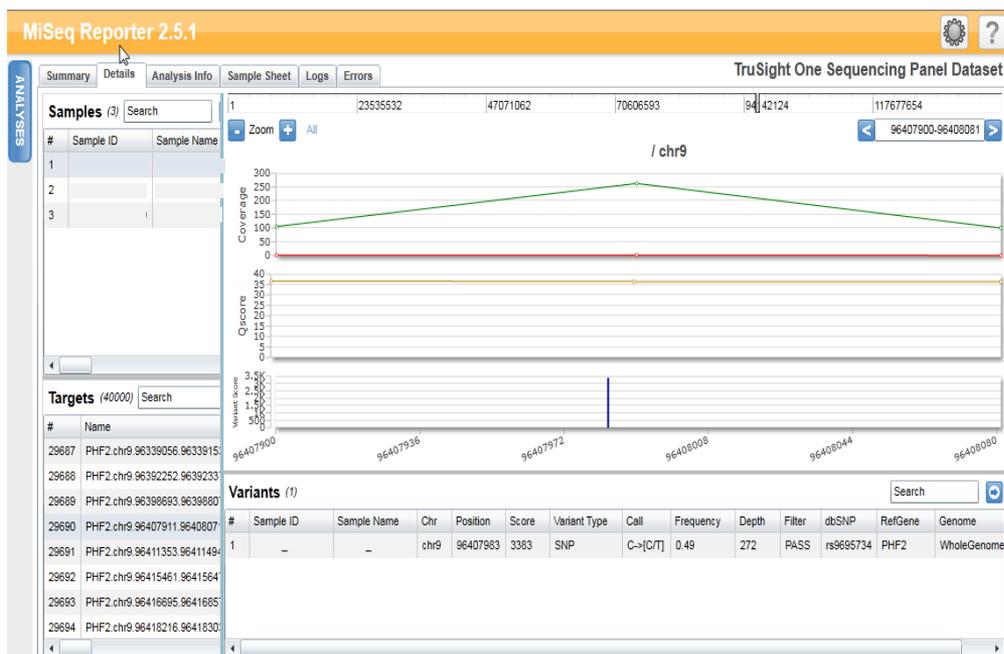
Sample Loading

Sample Sheet

MiSeq run

MiSeq reporter

- ▶ MiSeq Reporterによって、fastq生成・アラインメント・変異解析までラン終了後自動的に行われます
- ▶ MiSeq Reporter上で、各サンプルのそれぞれのサンプルのManifest file上のそれぞれのターゲット領域に対するカバレッジ、変異を確認できます
- ▶ vcf fileをVariant Studioに取り込むことで、簡単に目的の変異を絞り込むことができます（詳細はTruSight Oneウェビナー、ドライ編をご参照ください！）



TruSight One その他 資料

- ▶ TruSight One User Guideなど
http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit/documentation.html
- ▶ TruSight One Data Sheetなど
http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_one_panel.pdf
- ▶ TruSight One 遺伝子一覧
http://products.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/gene_lists/gene_list_trusight_one.zip
- ▶ TruSight One BaseSpace Public data
<https://basespace.illumina.com/datacentral>

The screenshot shows the BaseSpace Public Data interface. The navigation bar includes Dashboard, Prep, Runs, Projects, Apps, Public Data, and Help. The main content area is titled 'Public Data' and features a search bar. Below the search bar, a list of data sets is displayed, each with a title and associated tags. Two entries are highlighted with red boxes:

- > **TruSight One Sequencing Panel MiSeq Trio Data**
Targeted Sequencing
- > **NextSeq 500: TruSight One (CEPH Trio replicates)**
Targeted Sequencing

ご清聴ありがとうございました!

本日セッション終了後のご質問は、
techsupport@illumina.com
または、フリーダイヤル: 0800-111-5011
にお問い合わせください