

# 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

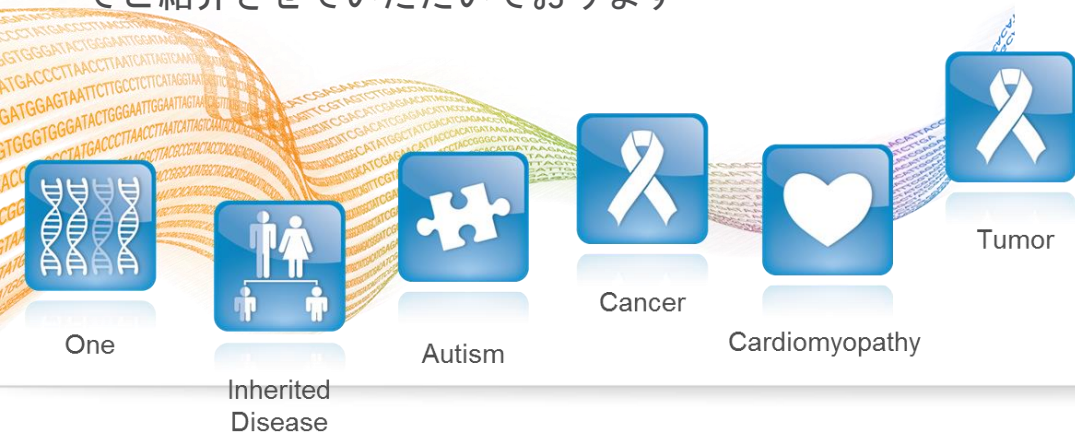
### <アプリケーション>

- ・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
<b>TruSight One</b>	<b>4813</b>	<b>12 Mb</b>	<b>既知の臨床的表現型に関連する4813遺伝子をターゲット</b>

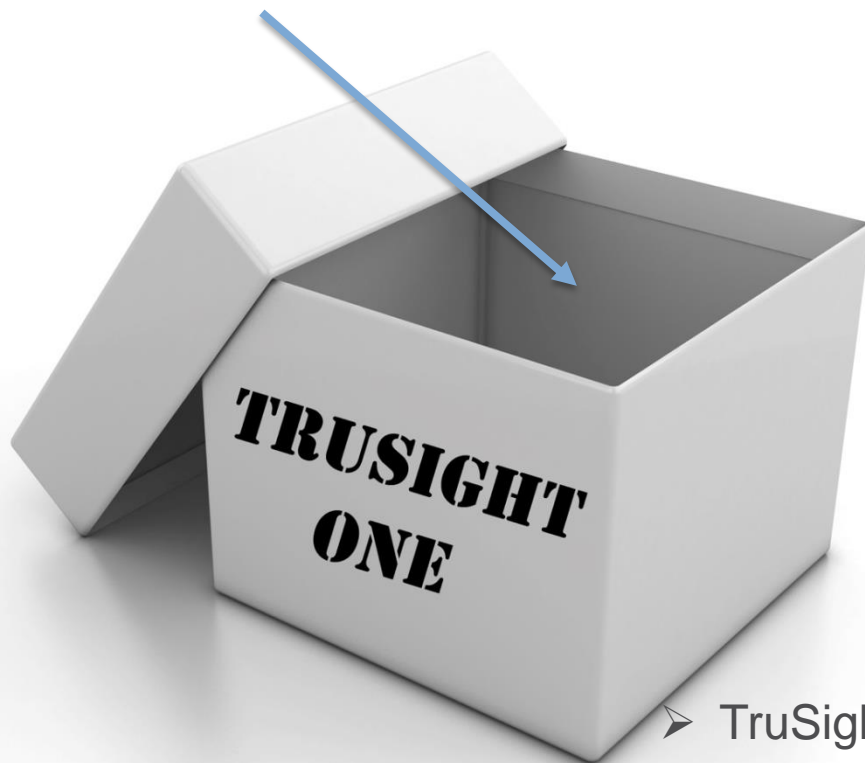
TruSight疾患パネルに関しましてはイルミナサポートウェビナー  
 「TruSight疾患パネルで疾患関連遺伝子だけを効率よく低コスト解析」  
 (2014/5/23)  
 でご紹介させていただいております



# 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)

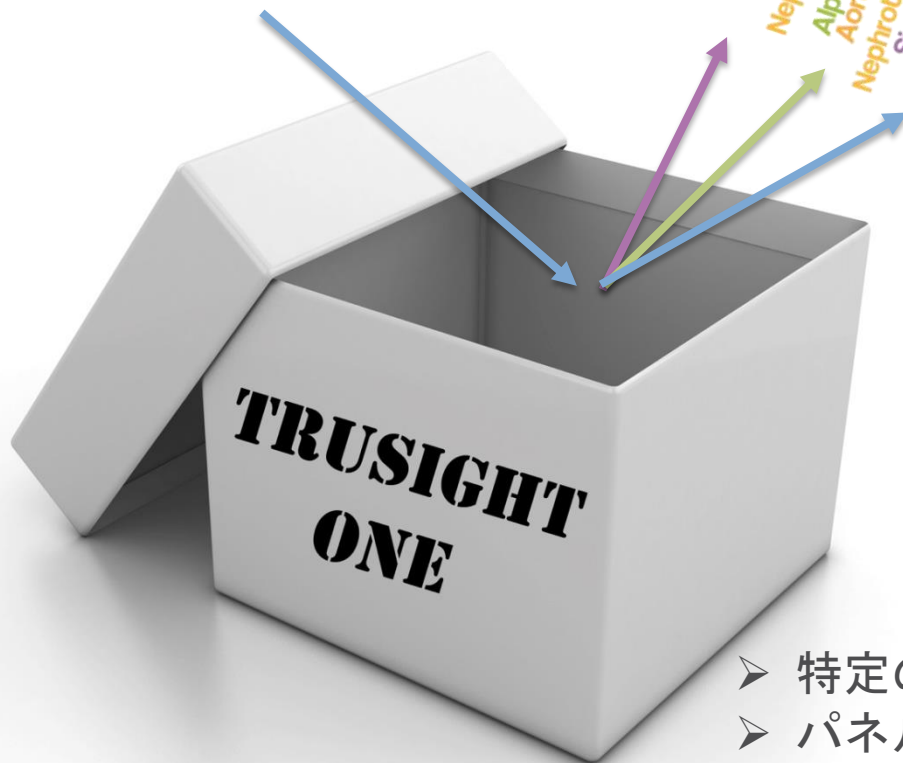
➤ TruSight Exomeに各種データベースの情報を追加



# 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



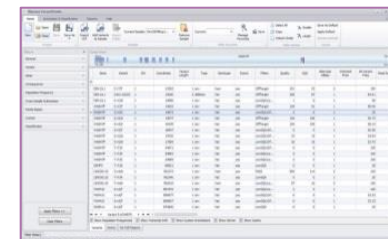
TruSight One



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



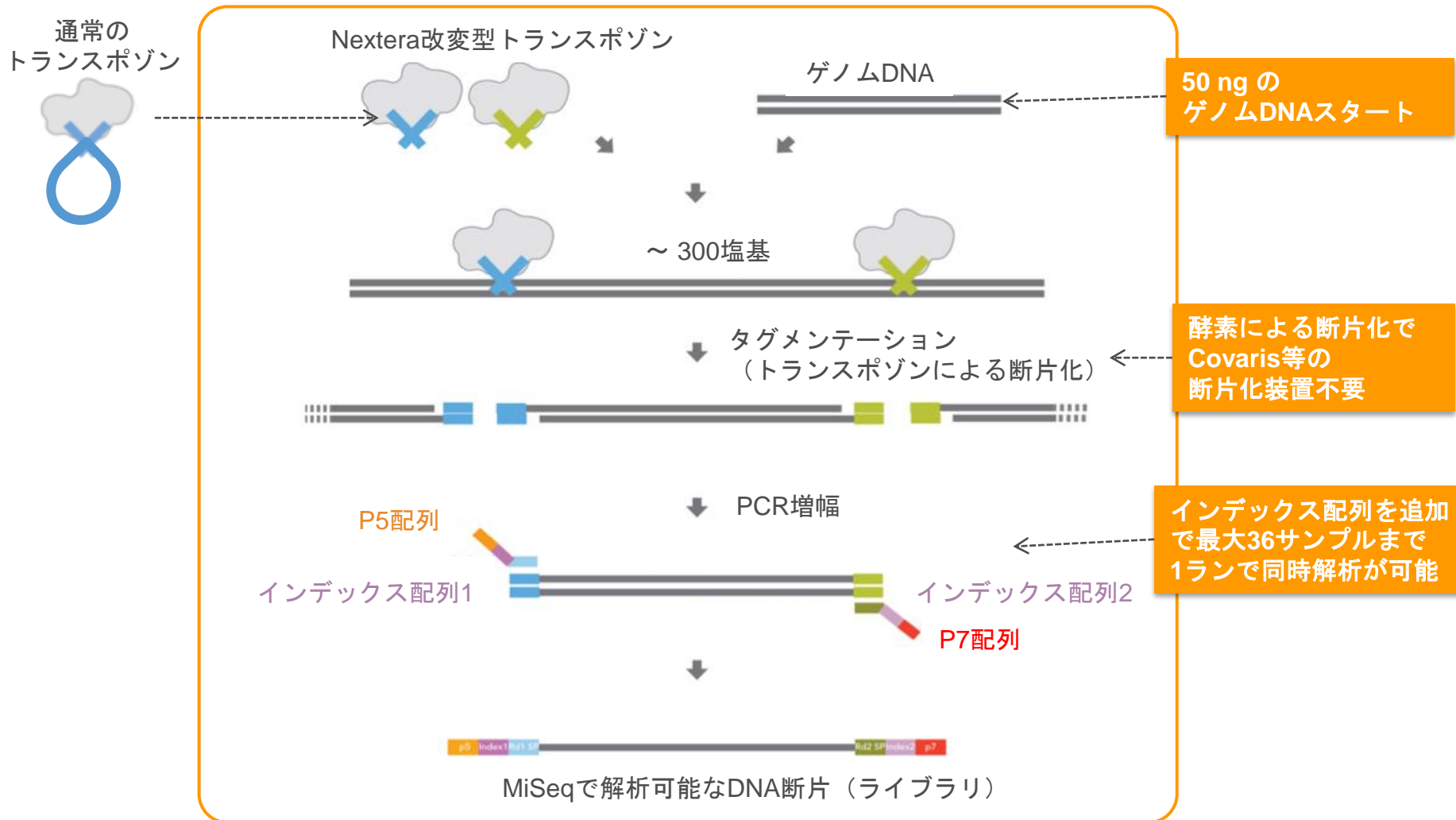
VariantStudio

A screenshot of the VariantStudio software interface, showing a detailed table of variant call data with columns for genomic coordinates, variant types, and quality scores.

# 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

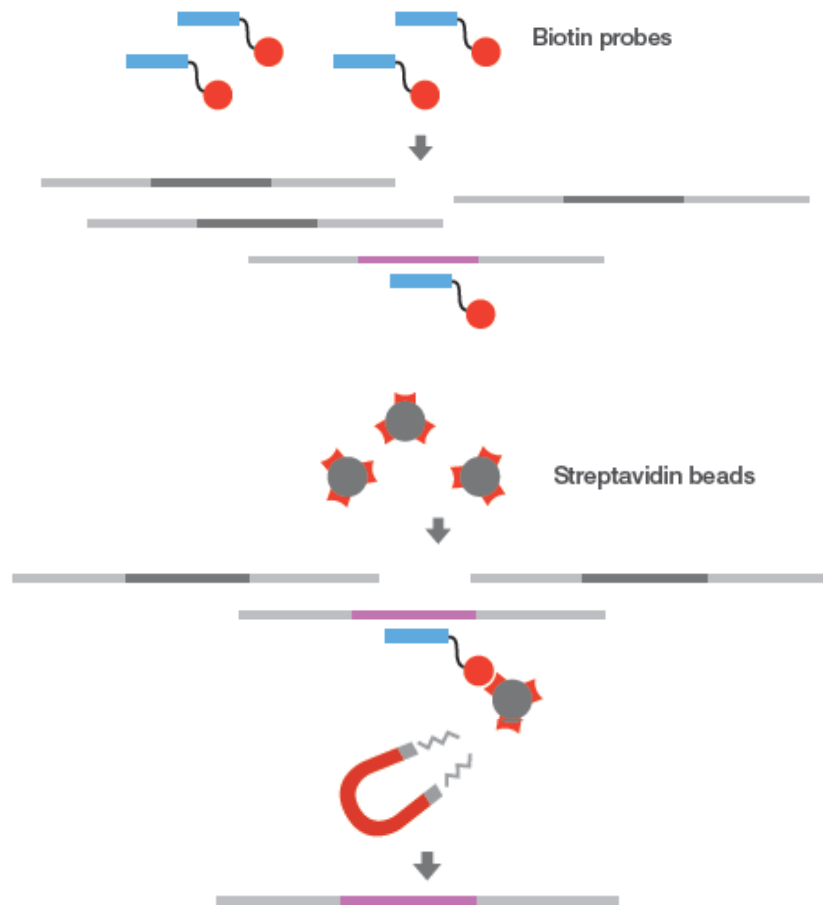
1ステップで断片化およびアダプターとインデックスの付加を実施



# TruSight Oneライブラリ調製のワークフロー

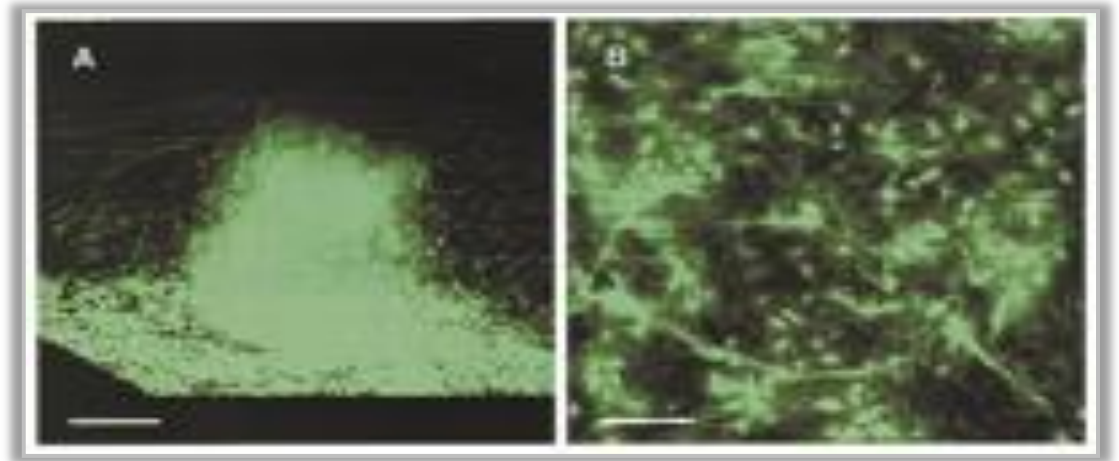
## ステップ2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

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

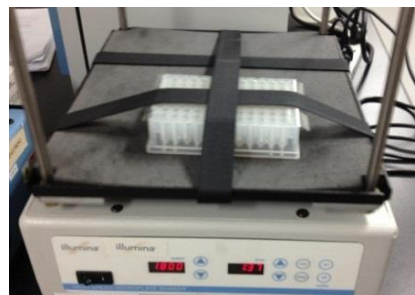
## Tagmentation



- ▶ 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)





# 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

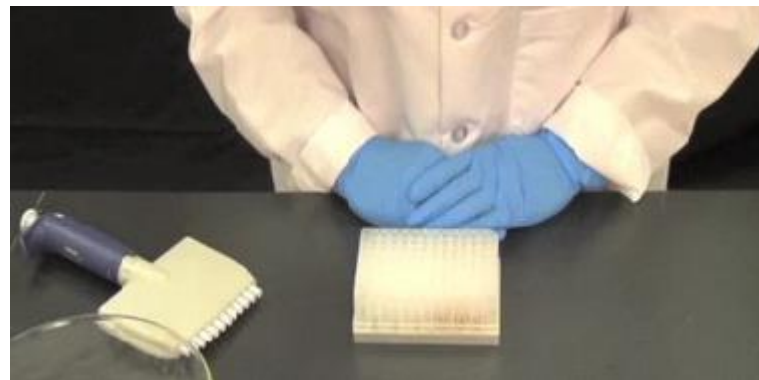


## ステップ 1: Nexteraライブラリ ステップ

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プレートを手磁石・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。
- ▶ 手磁石・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

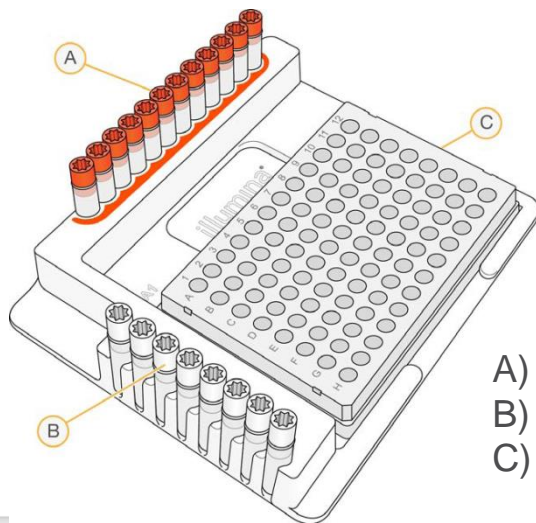
1<sup>st</sup> PCR



↓ 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

1<sup>st</sup> 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

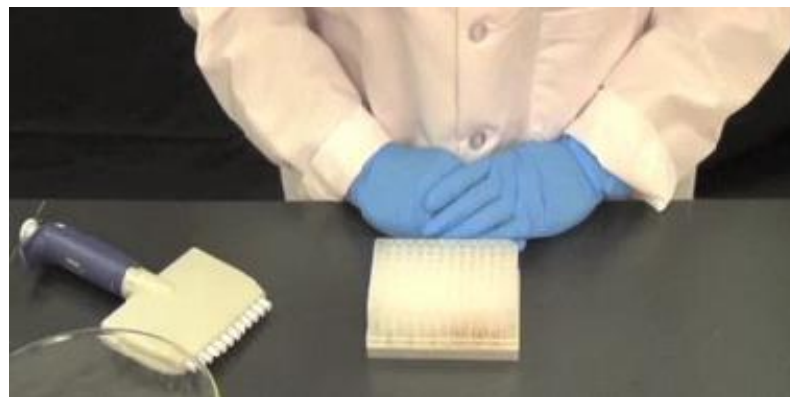
Tagmentation

Clean-up

1<sup>st</sup> PCR

1<sup>st</sup> PCR Clean Up

- ▶ PCRプレートと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

1<sup>st</sup> PCR

1<sup>st</sup> 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

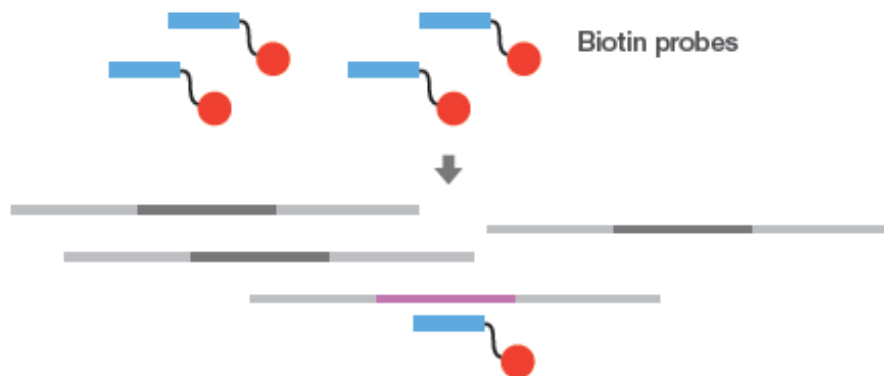
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/Q33217>

### <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

### 1<sup>st</sup> 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

### 1<sup>st</sup> 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
<b>Total Volume per Sample</b>	<b>100</b>

- ▶ 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

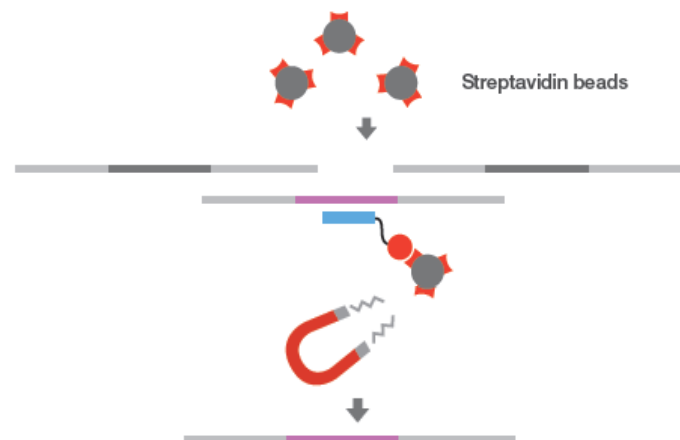
### <Best Practice>

- 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

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> Capture



- ▶ PCR プレーートを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

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> 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

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> 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
<b>Total Volume per Sample</b>	<b>30</b>

- ▶ 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）

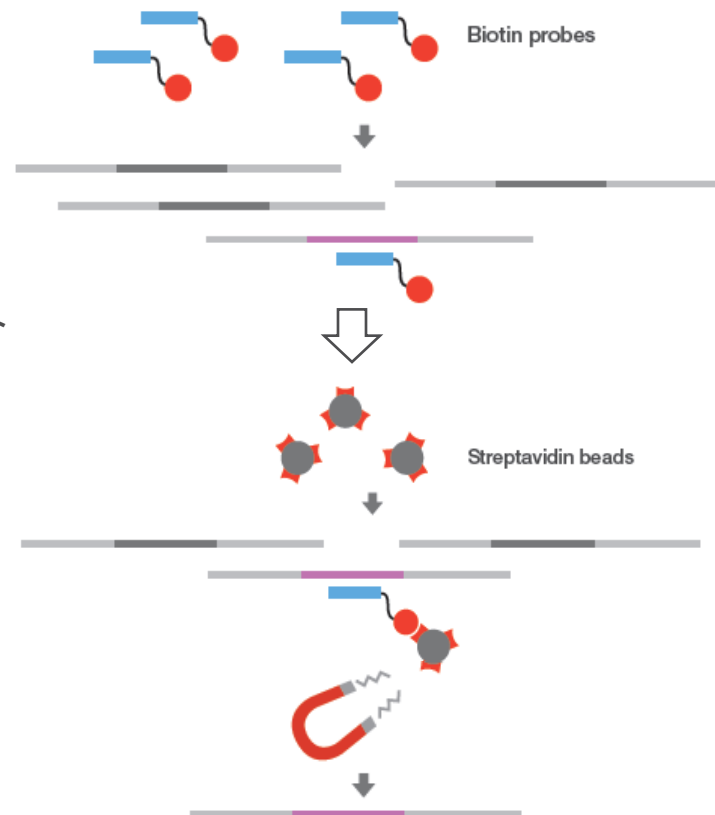
## ステップ 2: ターゲットDNAの濃縮ステップ

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> Capture

2<sup>nd</sup> Hybri&Capture

- ▶ 1<sup>st</sup> Hybridizationと1<sup>st</sup> Captureのステップを繰り返して実施、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

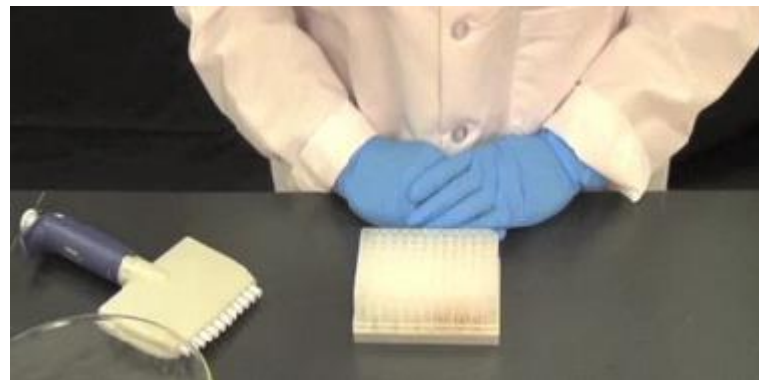
1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> Capture

2<sup>nd</sup> 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

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> Capture

2<sup>nd</sup> Hybri&Capture

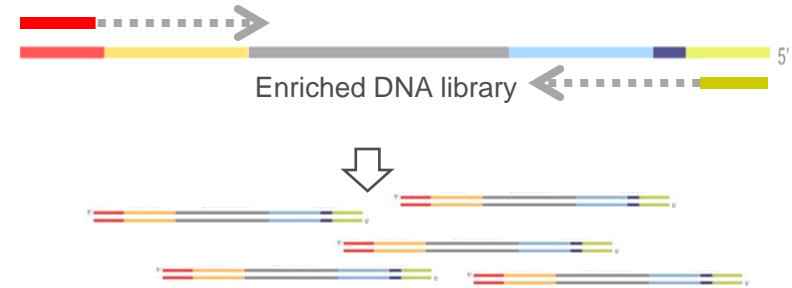
Sample Clean Up

2<sup>nd</sup> 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
  - 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



### <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

1<sup>st</sup> Hybridization

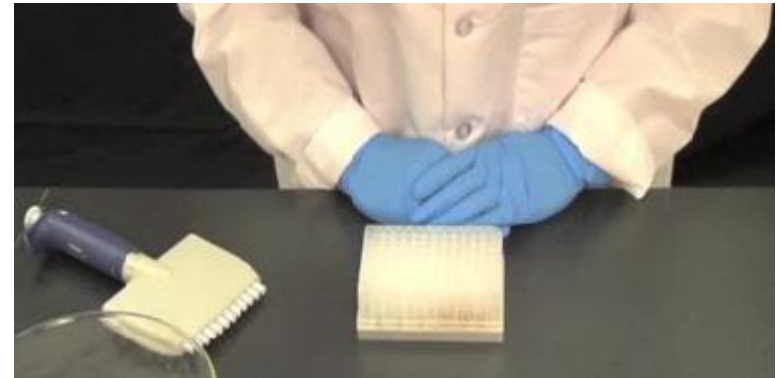
1<sup>st</sup> Capture

2<sup>nd</sup> Hybri&Capture

Sample Clean Up

2<sup>nd</sup> 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

1<sup>st</sup> Hybridization

1<sup>st</sup> Capture

2<sup>nd</sup> Hybri&Capture

Sample Clean Up

2<sup>nd</sup> 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>



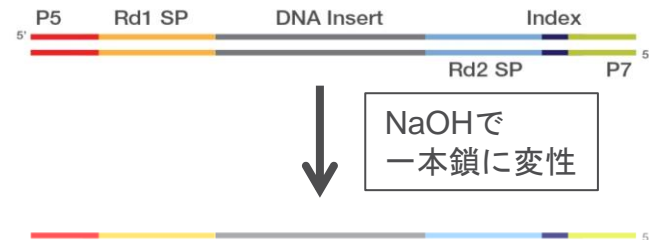
KAPA NGSライブラリ調製キット  
(Nihon Genetics)

[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



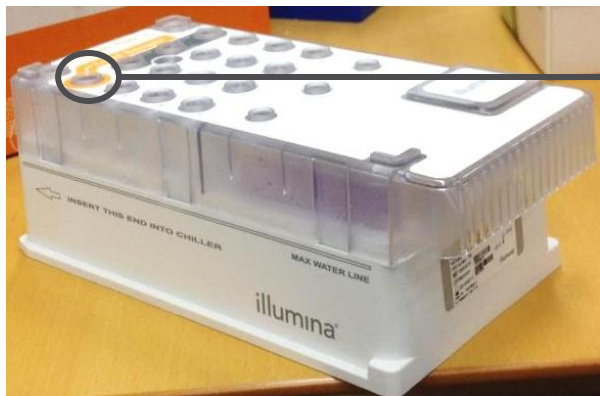
Hyb Bufferチューブ (HT1)  
MiSeq試薬に付属

## ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

Denature DNA

Sample Loading

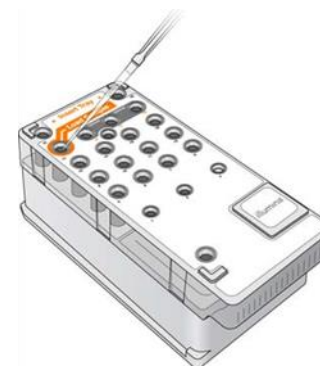
- ▶ MiSeq試薬カートリッジを冷凍庫から取り出して、溶解（水浴での溶解も可）
- ▶ 「Load Sample」（17番）のポジションに、希釈・変性済みのDNAライブラリーを600 ulロードする



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



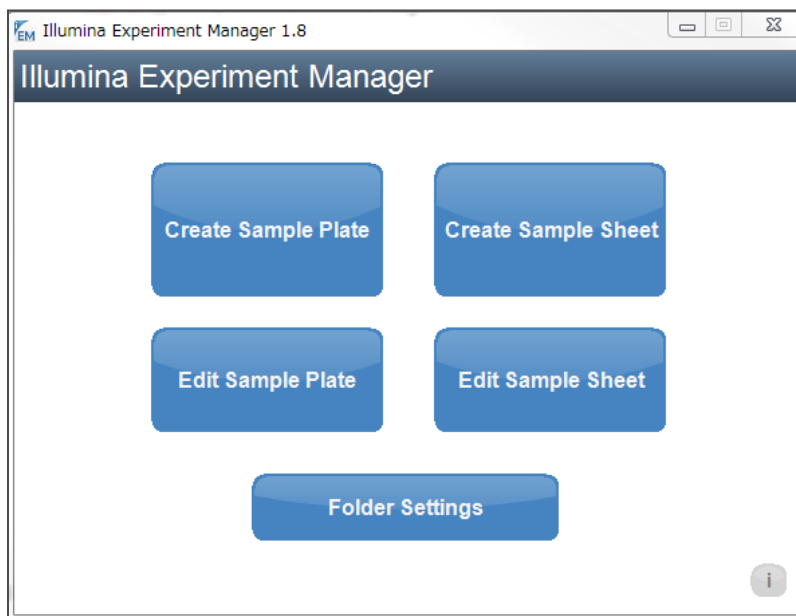
# ステップ 3: MiSeq ラン セットアップ

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         TAAGGCGA  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](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.chr1.985202.985412 chr1 985192 985402 0 0
AGRN.chr1.985644.985854 chr1 985634 985844 0 0
AGRN.chr1.986086.986296 chr1 986076 986286 0 0
AGRN.chr1.986528.986738 chr1 986518 986728 0 0
AGRN.chr1.986970.987180 chr1 986960 987170 0 0
AGRN.chr1.987412.987622 chr1 987402 987592 0 0
AGRN.chr1.987854.988064 chr1 987844 988034 0 0
AGRN.chr1.988296.988506 chr1 988286 988476 0 0
AGRN.chr1.988738.988948 chr1 988728 988918 0 0
AGRN.chr1.989180.989390 chr1 989170 989360 0 0
AGRN.chr1.989622.989832 chr1 989612 989802 0 0
AGRN.chr1.990064.990274 chr1 990054 990244 0 0
AGRN.chr1.990506.990716 chr1 990496 990686 0 0
AGRN.chr1.990948.991158 chr1 990938 991128 0 0
AGRN.chr1.991390.991600 chr1 991380 991570 0 0
AGRN.chr1.991832.992042 chr1 991822 992012 0 0
AGRN.chr1.992274.992484 chr1 992264 992454 0 0
AGRN.chr1.992716.992926 chr1 992706 992896 0 0
AGRN.chr1.993158.993368 chr1 993148 993338 0 0
AGRN.chr1.993600.993810 chr1 993590 993780 0 0
AGRN.chr1.994042.994252 chr1 994032 994222 0 0
AGRN.chr1.994484.994694 chr1 994474 994664 0 0
AGRN.chr1.994926.995136 chr1 994916 995106 0 0
AGRN.chr1.995368.995578 chr1 995358 995548 0 0
AGRN.chr1.995810.996020 chr1 995800 995990 0 0
AGRN.chr1.996252.996462 chr1 996242 996432 0 0
AGRN.chr1.996694.996904 chr1 996684 996874 0 0
AGRN.chr1.997136.997346 chr1 997126 997316 0 0
AGRN.chr1.997578.997788 chr1 997568 997758 0 0
AGRN.chr1.998020.998230 chr1 998010 998200 0 0
AGRN.chr1.998462.998672 chr1 998452 998642 0 0
AGRN.chr1.998904.999114 chr1 998894 999084 0 0
AGRN.chr1.999346.999556 chr1 999336 999526 0 0
AGRN.chr1.999788.1000000 chr1 999778 1000000 0 0
AGRN.chr1.1000430.1000640 chr1 1000420 1000610 0 0
AGRN.chr1.1000872.1001082 chr1 1000862 1001052 0 0
AGRN.chr1.1001314.1001524 chr1 1001304 1001494 0 0
AGRN.chr1.1001756.1001966 chr1 1001746 1001936 0 0
AGRN.chr1.1002198.1002408 chr1 1002188 1002378 0 0
AGRN.chr1.1002640.1002850 chr1 1002630 1002820 0 0
AGRN.chr1.1003082.1003292 chr1 1003072 1003262 0 0
AGRN.chr1.1003524.1003734 chr1 1003514 1003704 0 0
AGRN.chr1.1003966.1004176 chr1 1003956 1004146 0 0
AGRN.chr1.1004408.1004618 chr1 1004398 1004588 0 0
AGRN.chr1.1004850.1005060 chr1 1004840 1005030 0 0
AGRN.chr1.1005292.1005502 chr1 1005282 1005472 0 0
AGRN.chr1.1005734.1005944 chr1 1005724 1005914 0 0
AGRN.chr1.1006176.1006386 chr1 1006166 1006356 0 0
AGRN.chr1.1006618.1006828 chr1 1006608 1006798 0 0
AGRN.chr1.1007060.1007270 chr1 1007050 1007240 0 0
AGRN.chr1.1007502.1007712 chr1 1007492 1007682 0 0
AGRN.chr1.1007944.1008154 chr1 1007934 1008124 0 0
AGRN.chr1.1008386.1008596 chr1 1008376 1008566 0 0
AGRN.chr1.1008828.1009038 chr1 1008818 1009008 0 0
AGRN.chr1.1009270.1009480 chr1 1009260 1009450 0 0
AGRN.chr1.1009712.1009922 chr1 1009702 1009892 0 0
AGRN.chr1.1010154.1010364 chr1 1010144 1010334 0 0
AGRN.chr1.1010596.1010806 chr1 1010586 1010776 0 0
AGRN.chr1.1011038.1011248 chr1 1011028 1011218 0 0
AGRN.chr1.1011480.1011690 chr1 1011470 1011660 0 0
AGRN.chr1.1011922.1012132 chr1 1011912 1012102 0 0
AGRN.chr1.1012364.1012574 chr1 1012354 1012544 0 0
AGRN.chr1.1012806.1013016 chr1 1012796 1012986 0 0
AGRN.chr1.1013248.1013458 chr1 1013238 1013428 0 0
AGRN.chr1.1013690.1013900 chr1 1013680 1013870 0 0
AGRN.chr1.1014132.1014342 chr1 1014122 1014312 0 0
AGRN.chr1.1014574.1014784 chr1 1014564 1014754 0 0
AGRN.chr1.1015016.1015226 chr1 1015006 1015196 0 0
AGRN.chr1.1015458.1015668 chr1 1015448 1015638 0 0
AGRN.chr1.1015900.1016110 chr1 1015890 1016080 0 0
AGRN.chr1.1016342.1016552 chr1 1016332 1016522 0 0
AGRN.chr1.1016784.1016994 chr1 1016774 1016964 0 0
AGRN.chr1.1017226.1017436 chr1 1017216 1017406 0 0
AGRN.chr1.1017668.1017878 chr1 1017658 1017848 0 0
AGRN.chr1.1018110.1018320 chr1 1018100 1018290 0 0
AGRN.chr1.1018552.1018762 chr1 1018542 1018732 0 0
AGRN.chr1.1018994.1019204 chr1 1018984 1019174 0 0
AGRN.chr1.1019436.1019646 chr1 1019426 1019616 0 0
AGRN.chr1.1019878.1020088 chr1 1019868 1020058 0 0
AGRN.chr1.1020320.1020530 chr1 1020310 1020500 0 0
AGRN.chr1.1020762.1020972 chr1 1020752 1020942 0 0
AGRN.chr1.1021204.1021414 chr1 1021194 1021384 0 0
AGRN.chr1.1021646.1021856 chr1 1021636 1021826 0 0
AGRN.chr1.1022088.1022298 chr1 1022078 1022268 0 0
AGRN.chr1.1022530.1022740 chr1 1022520 1022710 0 0
AGRN.chr1.1022972.1023182 chr1 1022962 1023152 0 0
AGRN.chr1.1023414.1023624 chr1 1023404 1023594 0 0
AGRN.chr1.1023856.1024066 chr1 1023846 1024036 0 0
AGRN.chr1.1024298.1024508 chr1 1024288 1024478 0 0
AGRN.chr1.1024740.1024950 chr1 1024730 1024920 0 0
AGRN.chr1.1025182.1025392 chr1 1025172 1025362 0 0
AGRN.chr1.1025624.1025834 chr1 1025614 1025804 0 0
AGRN.chr1.1026066.1026276 chr1 1026056 1026246 0 0
AGRN.chr1.1026508.1026718 chr1 1026498 1026688 0 0
AGRN.chr1.1026950.1027160 chr1 1026940 1027130 0 0
AGRN.chr1.1027392.1027602 chr1 1027382 1027572 0 0
AGRN.chr1.1027834.1028044 chr1 1027824 1028014 0 0
AGRN.chr1.1028276.1028486 chr1 1028266 1028456 0 0
AGRN.chr1.1028718.1028928 chr1 1028708 1028898 0 0
AGRN.chr1.1029160.1029370 chr1 1029150 1029340 0 0
AGRN.chr1.1029602.1029812 chr1 1029592 1029782 0 0
AGRN.chr1.1030044.1030254 chr1 1030034 1030224 0 0
AGRN.chr1.1030486.1030696 chr1 1030476 1030666 0 0
AGRN.chr1.1030928.1031138 chr1 1030918 1031108 0 0
AGRN.chr1.1031370.1031580 chr1 1031360 1031550 0 0
AGRN.chr1.1031812.1032022 chr1 1031802 1031992 0 0
AGRN.chr1.1032254.1032464 chr1 1032244 1032434 0 0
AGRN.chr1.1032696.1032906 chr1 1032686 1032876 0 0
AGRN.chr1.1033138.1033348 chr1 1033128 1033318 0 0
AGRN.chr1.1033580.1033790 chr1 1033570 1033760 0 0
AGRN.chr1.1034022.1034232 chr1 1034012 1034202 0 0
AGRN.chr1.1034464.1034674 chr1 1034454 1034644 0 0
AGRN.chr1.1034906.1035116 chr1 1034896 1035086 0 0
AGRN.chr1.1035348.1035558 chr1 1035338 1035528 0 0
AGRN.chr1.1035790.1035999 chr1 1035780 1035970 0 0
AGRN.chr1.1036232.1036442 chr1 1036222 1036412 0 0
AGRN.chr1.1036674.1036884 chr1 1036664 1036854 0 0
AGRN.chr1.1037116.1037326 chr1 1037106 1037296 0 0
AGRN.chr1.1037558.1037768 chr1 1037548 1037738 0 0
AGRN.chr1.1038000.1038210 chr1 1037990 1038180 0 0
AGRN.chr1.1038442.1038652 chr1 1038432 1038622 0 0
AGRN.chr1.1038884.1039094 chr1 1038874 1039064 0 0
AGRN.chr1.1039326.1039536 chr1 1039316 1039506 0 0
AGRN.chr1.1039768.1040000 chr1 1039758 1040000 0 0
AGRN.chr1.1040210.1040420 chr1 1040200 1040390 0 0
AGRN.chr1.1040652.1040862 chr1 1040642 1040832 0 0
AGRN.chr1.1041094.1041304 chr1 1041084 1041274 0 0
AGRN.chr1.1041536.1041746 chr1 1041526 1041716 0 0
AGRN.chr1.1041978.1042188 chr1 1041968 1042158 0 0
AGRN.chr1.1042420.1042630 chr1 1042410 1042600 0 0
AGRN.chr1.1042862.1043072 chr1 1042852 1043042 0 0
AGRN.chr1.1043304.1043514 chr1 1043294 1043484 0 0
AGRN.chr1.1043746.1043956 chr1 1043736 1043926 0 0
AGRN.chr1.1044188.1044398 chr1 1044178 1044368 0 0
AGRN.chr1.1044630.1044840 chr1 1044620 1044810 0 0
AGRN.chr1.1045072.1045282 chr1 1045062 1045252 0 0
AGRN.chr1.1045514.1045724 chr1 1045504 1045694 0 0
AGRN.chr1.1045956.1046166 chr1 1045946 1046136 0 0
AGRN.chr1.1046398.1046608 chr1 1046388 1046578 0 0
AGRN.chr1.1046840.1047050 chr1 1046830 1047020 0 0
AGRN.chr1.1047282.1047492 chr1 1047272 1047462 0 0
AGRN.chr1.1047724.1047934 chr1 1047714 1047904 0 0
AGRN.chr1.1048166.1048376 chr1 1048156 1048346 0 0
AGRN.chr1.1048608.1048818 chr1 1048598 1048788 0 0
AGRN.chr1.1049050.1049260 chr1 1049040 1049230 0 0
AGRN.chr1.1049492.1049702 chr1 1049482 1049672 0 0
AGRN.chr1.1049934.1050144 chr1 1049924 1050114 0 0
AGRN.chr1.1050376.1050586 chr1 1050366 1050556 0 0
AGRN.chr1.1050818.1051028 chr1 1050808 1050998 0 0
AGRN.chr1.1051260.1051470 chr1 1051250 1051440 0 0
AGRN.chr1.1051702.1051912 chr1 1051692 1051882 0 0
AGRN.chr1.1052144.1052354 chr1 1052134 1052324 0 0
AGRN.chr1.1052586.1052796 chr1 1052576 1052766 0 0
AGRN.chr1.1053028.1053238 chr1 1053018 1053208 0 0
AGRN.chr1.1053470.1053680 chr1 1053460 1053650 0 0
AGRN.chr1.1053912.1054122 chr1 1053902 1054092 0 0
AGRN.chr1.1054354.1054564 chr1 1054344 1054534 0 0
AGRN.chr1.1054796.1055006 chr1 1054786 1054976 0 0
AGRN.chr1.1055238.1055448 chr1 1055228 1055418 0 0
AGRN.chr1.1055680.1055890 chr1 1055670 1055860 0 0
AGRN.chr1.1056122.1056332 chr1 1056112 1056302 0 0
AGRN.chr1.1056564.1056774 chr1 1056554 1056744 0 0
AGRN.chr1.1057006.1057216 chr1 1056996 1057186 0 0
AGRN.chr1.1057448.1057658 chr1 1057438 1057628 0 0
AGRN.chr1.1057890.1058100 chr1 1057880 1058070 0 0
AGRN.chr1.1058332.1058542 chr1 1058322 1058512 0 0
AGRN.chr1.1058774.1058984 chr1 1058764 1058954 0 0
AGRN.chr1.1059216.1059426 chr1 1059206 1059396 0 0
AGRN.chr1.1059658.1059868 chr1 1059648 1059838 0 0
AGRN.chr1.1060100.1060310 chr1 1060090 1060280 0 0
AGRN.chr1.1060542.1060752 chr1 1060532 1060722 0 0
AGRN.chr1.1060984.1061194 chr1 1060974 1061164 0 0
AGRN.chr1.1061426.1061636 chr1 1061416 1061606 0 0
AGRN.chr1.1061868.1062078 chr1 1061858 1062048 0 0
AGRN.chr1.1062310.1062520 chr1 1062300 1062490 0 0
AGRN.chr1.1062752.1062962 chr1 1062742 1062932 0 0
AGRN.chr1.1063194.1063404 chr1 1063184 1063374 0 0
AGRN.chr1.1063636.1063846 chr1 1063626 1063816 0 0
AGRN.chr1.1064078.1064288 chr1 1064068 1064258 0 0
AGRN.chr1.1064520.1064730 chr1 1064510 1064700 0 0
AGRN.chr1.1064962.1065172 chr1 1064952 1065142 0 0
AGRN.chr1.1065404.1065614 chr1 1065394 1065584 0 0
AGRN.chr1.1065846.1066056 chr1 1065836 1066026 0 0
AGRN.chr1.1066288.1066498 chr1 1066278 1066468 0 0
AGRN.chr1.1066730.1066940 chr1 1066720 1066910 0 0
AGRN.chr1.1067172.1067382 chr1 1067162 1067352 0 0
AGRN.chr1.1067614.1067824 chr1 1067604 1067794 0 0
AGRN.chr1.1068056.1068266 chr1 1068046 1068236 0 0
AGRN.chr1.1068498.1068708 chr1 1068488 1068678 0 0
AGRN.chr1.1068940.1069150 chr1 1068930 1069120 0 0
AGRN.chr1.1069382.1069592 chr1 1069372 1069562 0 0
AGRN.chr1.1069824.1070034 chr1 1069814 1070004 0 0
AGRN.chr1.1070266.1070476 chr1 1070256 1070446 0 0
AGRN.chr1.1070708.1070918 chr1 1070698 1070888 0 0
AGRN.chr1.1071150.1071360 chr1 1071140 1071330 0 0
AGRN.chr1.1071592.1071802 chr1 1071582 1071772 0 0
AGRN.chr1.1072034.1072244 chr1 1072024 1072214 0 0
AGRN.chr1.1072476.1072686 chr1 1072466 1072656 0 0
AGRN.chr1.1072918.1073128 chr1 1072908 1073098 0 0
AGRN.chr1.1073360.1073570 chr1 1073350 1073540 0 0
AGRN.chr1.1073802.1074012 chr1 1073792 1073982 0 0
AGRN.chr1.1074244.1074454 chr1 1074234 1074424 0 0
AGRN.chr1.1074686.1074896 chr1 1074676 1074866 0 0
AGRN.chr1.1075128.1075338 chr1 1075118 1075308 0 0
AGRN.chr1.1075570.1075780 chr1 1075560 1075750 0 0
AGRN.chr1.1076012.1076222 chr1 1076002 1076192 0 0
AGRN.chr1.1076454.1076664 chr1 1076444 1076634 0 0
AGRN.chr1.1076896.1077106 chr1 1076886 1077076 0 0
AGRN.chr1.1077338.1077548 chr1 1077328 1077518 0 0
AGRN.chr1.1077780.1077990 chr1 1077770 1077960 0 0
AGRN.chr1.1078222.1078432 chr1 1078212 1078402 0 0
AGRN.chr1.1078664.1078874 chr1 1078654 1078844 0 0
AGRN.chr1.1079106.1079316 chr1 1079096 1079286 0 0
AGRN.chr1.1079548.1079758 chr1 1079538 1079728 0 0
AGRN.chr1.1080000.1080210 chr1 1079990 1080180 0 0
AGRN.chr1.1080442.1080652 chr1 1080432 1080622 0 0
AGRN.chr1.1080884.1081094 chr1 1080874 1081064 0 0
AGRN.chr1.1081326.1081536 chr1 1081316 1081506 0 0
AGRN.chr1.1081768.1081978 chr1 1081758 1081948 0 0
AGRN.chr1.1082210.1082420 chr1 1082200 1082390 0 0
AGRN.chr1.1082652.1082862 chr1 1082642 1082832 0 0
AGRN.chr1.1083094.1083304 chr1 1083084 1083274 0 0
AGRN.chr1.1083536.1083746 chr1 1083526 1083716 0 0
AGRN.chr1.1083978.1084188 chr1 1083968 1084158 0 0
AGRN.chr1.1084420.1084630 chr1 1084410 1084600 0 0
AGRN.chr1.1084862.1085072 chr1 1084852 1085042 0 0
AGRN.chr1.1085304.1085514 chr1 1085294 1085484 0 0
AGRN.chr1.1085746.1085956 chr1 1085736 1085926 0 0
AGRN.chr1.1086188.1086398 chr1 1086178 1086368 0 0
AGRN.chr1.1086630.1086840 chr1 1086620 1086810 0 0
AGRN.chr1.1087072.1087282 chr1 1087062 1087252 0 0
AGRN.chr1.1087514.1087724 chr1 1087504 1087694 0 0
AGRN.chr1.1087956.1088166 chr1 1087946 1088136 0 0
AGRN.chr1.1088398.1088608 chr1 1088388 1088578 0 0
AGRN.chr1.1088840.1089050 chr1 1088830 1089020 0 0
AGRN.chr1.1089282.1089492 chr1 1089272 1089462 0 0
AGRN.chr1.1089724.1089934 chr1 1089714 1089904 0 0
AGRN.chr1.1090166.1090376 chr1 1090156 1090346 0 0
AGRN.chr1.1090608.1090818 chr1 1090598 1090788 0 0
AGRN.chr1.1091050.1091260 chr1 1091040 1091230 0 0
AGRN.chr1.1091492.1091702 chr1 1091482 1091672 0 0
AGRN.chr1.1091934.1092144 chr1 1091924 1092114 0 0
AGRN.chr1.1092376.1092586 chr1 1092366 1092556 0 0
AGRN.chr1.1092818.1093028 chr1 1092808 1092998 0 0
AGRN.chr1.1093260.1093470 chr1 1093250 1093440 0 0
AGRN.chr1.1093702.1093912 chr1 1093692 1093882 0 0
AGRN.chr1.1094144.1094354 chr1 1094134 1094324 0 0
AGRN.chr1.1094586.1094796 chr1 1094576 1094766 0 0
AGRN.chr1.1095028.1095238 chr1 1095018 1095208 0 0
AGRN.chr1.1095470.1095680 chr1 1095460 1095650 0 0
AGRN.chr1.1095912.1096122 chr1 1095902 1096092 0 0
AGRN.chr1.1096
```

# 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

Sample Sheet Status: Valid  
Reason:

Cancel Back Finish

Buttons: Add Blank Row, Remove Selected Rows, ?

# 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](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

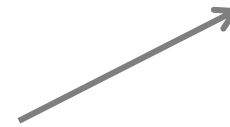
Denature DNA

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

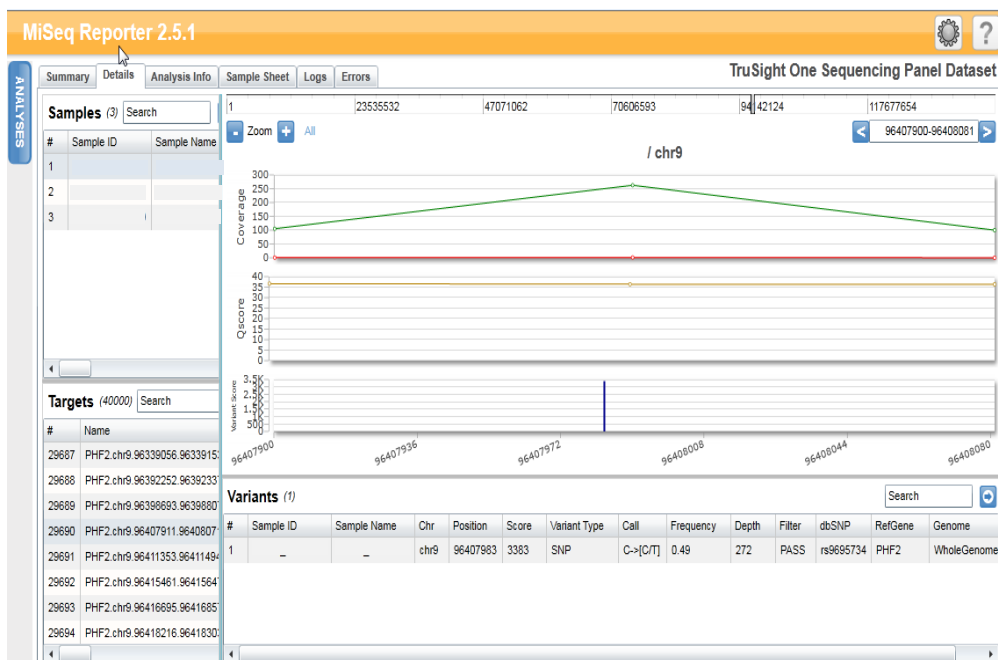
Sample Loading

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](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](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](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 data sets 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](mailto: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