

NGSをはじめよう！ サンプルシート作成ソフト Illumina Experiment Manager (IEM) の使い方

February 20, 2015



米田 瑞穂

イルミナ株式会社テクニカルサポート部
テクニカルアプリケーション サイエнтиスト

© 2014 Illumina, Inc. All rights reserved. Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, ForenSeq, MiSeq, MiSeqDx, MiSeqFGx, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®

本日のOutline

- ▶ IEMのインストール方法
- ▶ IEMのワークフロー
- ▶ サンプルシートの作成方法



illumina Experiment Manager とは？

illumina Experiment Manager (IEM)は、
イルミナNGSのサンプルシートを作成するためのソフトウェアです。

- ▶ **フリーソフトウェア**
(弊社ウェブページからダウンロード可能)
- ▶ **ウィザードベースで作成**

IEMインストーラーのダウンロード

① 弊社のウェブページ<http://www.illumina.co.jp>からサポート→シーケンサー・ソフトウェアを選択

The screenshot shows the Illumina website's navigation menu. The 'サポート' (Support) tab is highlighted with a red box. Underneath, the 'シーケンサー' (Sequencer) category is also highlighted with a red box, and the 'ソフトウェア' (Software) sub-item is selected with a mouse cursor. The website header includes the Illumina logo, a search bar, and navigation links for 'アプリケーション', 'システム', 'インフォマティクス', '臨床研究', '受託サービス', 'サイエンス', 'サポート', and 'カンパニー'. The main content area is divided into four columns: 'シーケンサー' (Sequencer), 'マイクロアレイ' (Microarray), 'リアルタイムPCR' (Real-time PCR), and 'トレーニング' (Training). Each column lists various products and services, including 'ソフトウェア' (Software) under the Sequencer category. The bottom of the page features a banner with images of Illumina sequencing machines and promotional text for 'MiSeq シーケンズ試薬キット 20% オフキャンペーン', '生産性のパワーを拡大', 'HiSeq X シリーズ', and 'すべての規模にシーケンズのパワーを'. A login form is visible on the right side of the banner area.

IEMのインストール

② Experiment Managerを選択

The screenshot shows the Illumina website's navigation menu. The 'サポート' (Support) tab is selected. Below the navigation bar, the breadcrumb trail reads 'サポート >> シーケンス >> ソフトウェア'. The main content area is a grid of software tools categorized by 'STAGE' and 'SOFTWARE'. The 'EXPERIMENTAL DESIGN' stage is highlighted, and 'Experiment Manager' is circled in red with a mouse cursor pointing to it.

STAGE	EXPERIMENTAL DESIGN	CLUSTER GENERATION	INSTRUMENT CONTROL IMAGE ANALYSIS	BASE CALLING Q-SCORING	FILE CONVERSION	DEMULTIPLEXING	ALIGNMENT	VARIANT CALLING VARIANT COUNTING	VISUALIZATION
SOFTWARE	Design Studio								
	Experiment Manager								
	blueFuse Workflow Manager								
		cBot Control							
			MiSeq Control/RTA						
			NextSeq Control/RTA2						
				HiSeq Control/RTA					
				GA Sequencing Control RTA					
				Sequencing Analysis Viewer					
					Off-Line Basecaller				
						Analysis Visual Controller			
							MiSeq Reporter		
								BaseSpace	
								BaseSpace Onsite	
								CASAVA	
							HiSeq Analysis Software		
								iGenomes	

IEMのインストール

③ ダウンロードを選択

illumina®

Log in to get personalized account information. Quick Order MyIllumina Tools

Contact Us MyIllumina Tools

APPLICATIONS SYSTEMS INFORMATICS CLINICAL SERVICES SCIENCE SUPPORT COMPANY

Support » Sequencing » Sequencing Software » Experiment Manager

Experiment Manager Support

- Overview
- Computing Requirements
- Downloads**
- Documentation & Literature
- Training

Experiment Manager

Latest Updates

- [Illumina Experiment Manager Guide \(15031335\)](#) 06/19/2014
- [Illumina Experiment Manager v1.8](#) 06/19/2014
- [IEM TruSeq DNA, RNA, or ChIP Quick Reference Card](#) 04/30/2014

User Guide

- [Illumina Experiment Manager Guide \(15031335\)](#)

The Illumina Experiment Manager software helps you create and edit well-formed sample sheets for Illumina sequencers and analysis software.

Illumina recommends using the Experiment Manager before starting sample or library preparation. The Experiment Manager can detect and warn of sub-optimal index combinations. By creating the sample sheet prior to sample or library preparation, you can try a different index combination without risking your samples.

You can use the Illumina Experiment Manager to create sample sheets for any Illumina sequencer and for any Nextera or TruSeq libraries.

IEM

IEMのインストール

④Illumina Experiment Managerを選択(2015年2月時点で最新版はv1.8)

illumina®

Log in to get personalized account information. Quick Order View Cart

Contact Us MyIllumina Tools

APPLICATIONS SYSTEMS INFORMATICS CLINICAL SERVICES SCIENCE SUPPORT COMPANY

Support » Sequencing » Sequencing Software » Experiment Manager » Downloads

Experiment Manager Support

- Overview
- Computing Requirements
- Downloads
- Documentation & Literature
- Training

Downloads

DESCRIPTION	FILE INFO	DATE
Illumina Experiment Manager v1.8 The Illumina Experiment Manager v1.8 is a desktop tool that guides you in building library plates and creating the sample sheet used for sequencing on the MiSeq, NextSeq, or HiSeq systems. Minimum System Requirements: Windows Vista or 7 Operating System; 32-bit system, 4 GB RAM or 64-bit system, 8 GB RAM; Microsoft.Net Framework 4.0 or above; Microsoft Office Excel (recommended).	ZIP (2 MB)	08/19/2014
Illumina Experiment Manager v1.8 Release Notes	PDF (< 1 MB)	08/19/2014

.zip形式でダウンロードできます

IEMのインストールと開始

ソフトウェアのダウンロード

- Support>Sequencing Supports>Downloads
>Illumina Experiment Manager v1.8

ソフトウェアのインストール

- Setup.exe ファイルを開けてインストール
- インストレーションウィザードに従ってNextを選択

ソフトウェアの開始

- デスクトップ上のIEMのアイコンをクリック

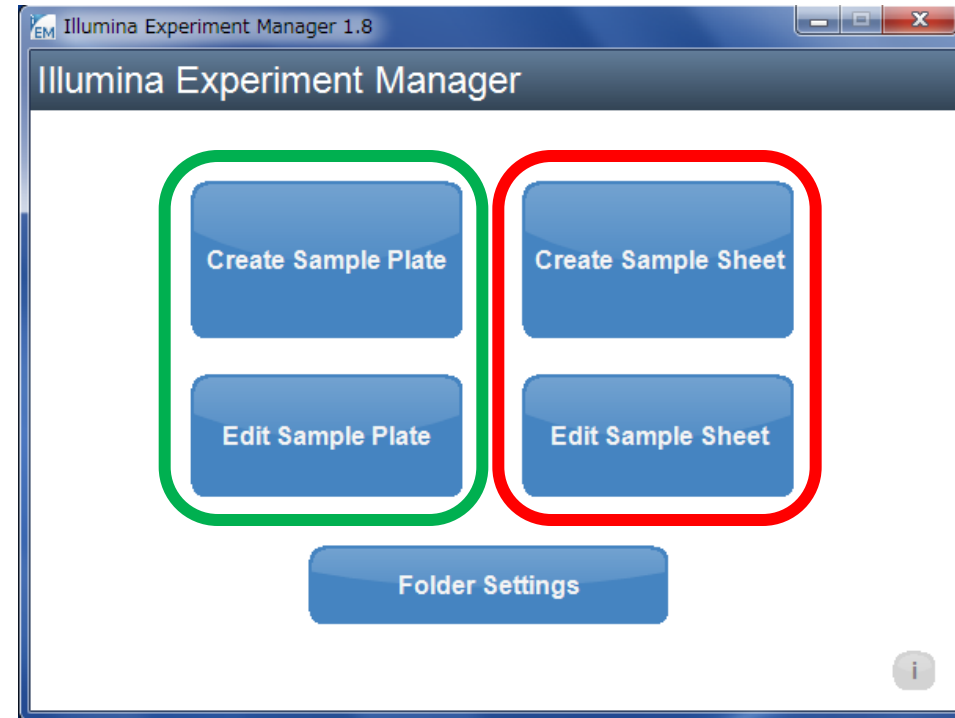
サンプルシートとは？

▶ サンプルシート: (.csv)

- ランの条件
- データ解析の条件
- マニフェスト
- 参照ゲノム配列

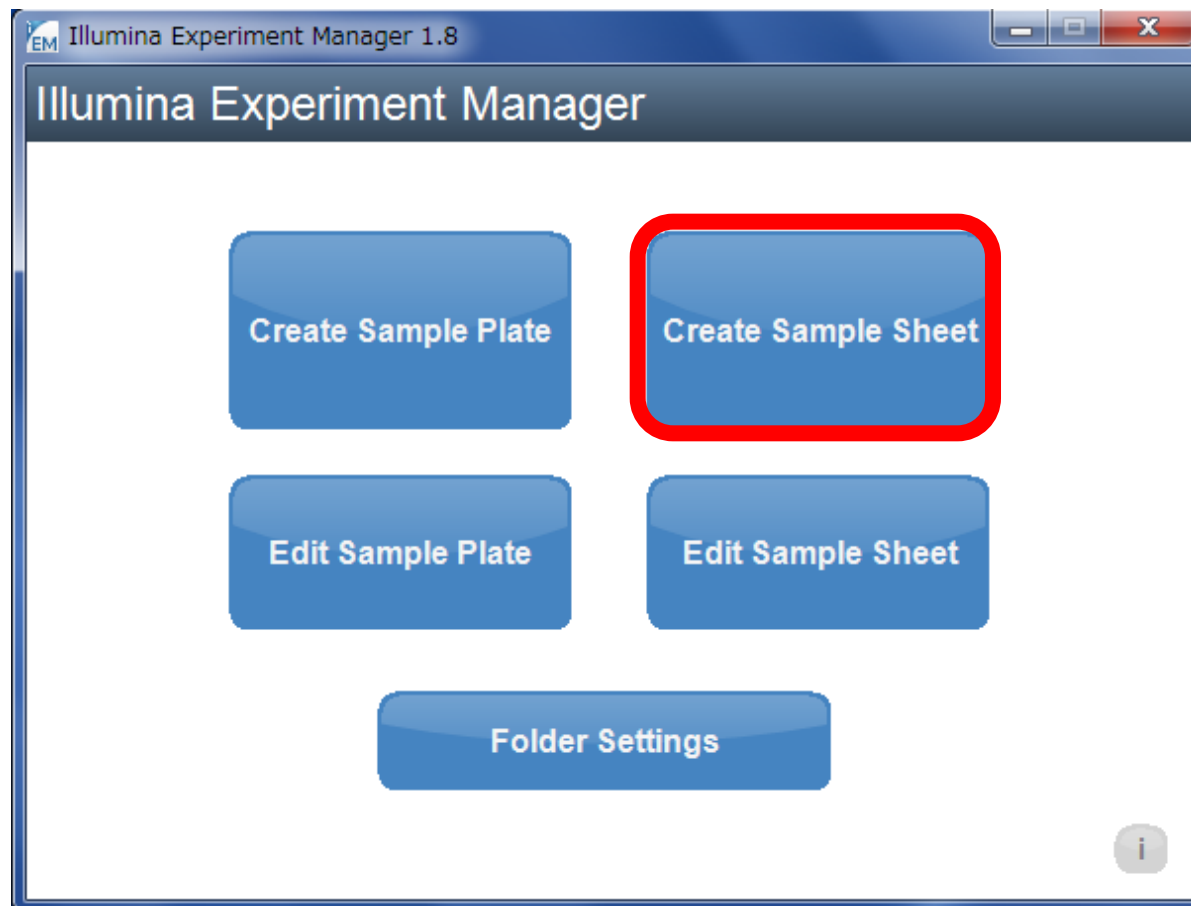
▶ サンプルプレート: (.plt)

- キットのタイプ
- プレート名
- インデックス



作成はライブラリー調製の前

サンプルシートの作成



サンプルシート の作成 – Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection



MiSeq



HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA



NextSeq

Cancel

Next

サンプルシート作成 – Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection

1



MiSeq

MiSeqに対応する
サンプルシート作成

2



HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA

HCS/CASAVA
に準拠した
サンプルシート作成

3



NextSeq

NextSeq500に対応する
サンプルシート作成

サンプルシート の作成 – Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection



MiSeq



HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA



NextSeq

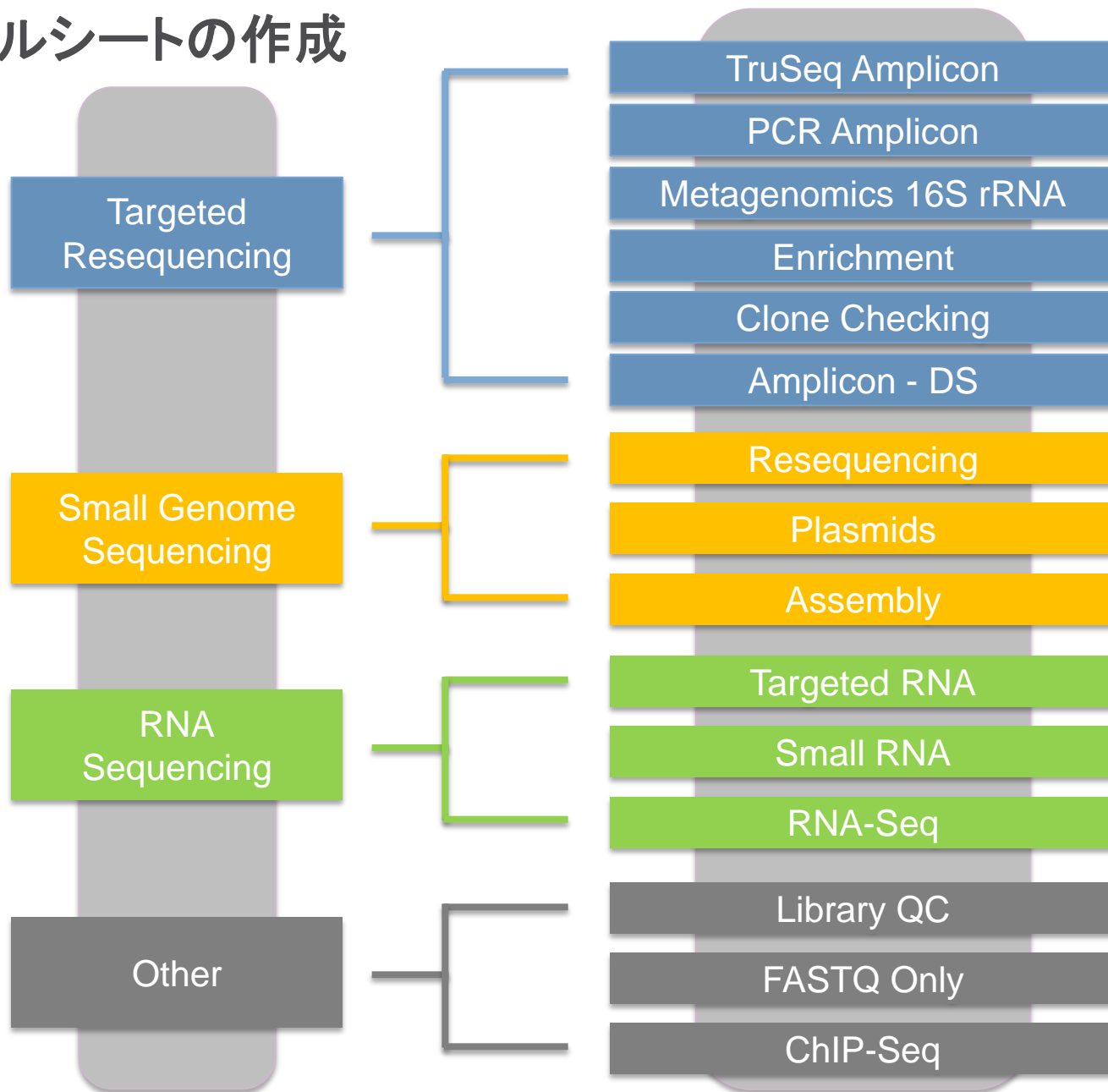
Cancel

Next

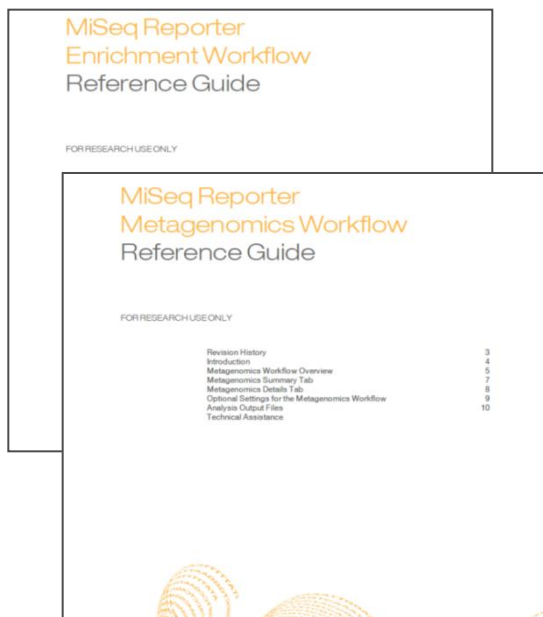
サンプルシートの作成



サンプルシートの作成



MiSeq Reporterについて



Reference Guide

http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/misseq_reporter.ilmn

MiSeq Reporter Theory of Operation

http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/misseq_reporter/documentation.ilmn



サポートウェビナーシリーズ2013 「MiSeq Reporterアップデート」2013/11/01

http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss

サンプルシートの作成 – Application Selectionの選択



サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

Resequencing Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*

Sample Prep Kit

Index Reads 0 1 2

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

* - required field

Resequencing Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Use Somatic Variant Caller

Flag PCR Duplicates

Reverse Complement

Indel Realignment GATK

Variant Quality

Cancel Back Next

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択



- ▶ **V2試薬の場合**
–500サイクルキット MSxxxxxxx-500**V2**
- ▶ **V3試薬の場合**
–600サイクルキット MSxxxxxxx-600**V3**

※バーコード**末尾のV2またはV3**まで入力してください

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

Resequencing Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*

Sample Prep Kit

Index Reads 0 1 2

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

* - required field

Resequencing Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Use Somatic Variant Caller

Flag PCR Duplicates

Reverse Complement

Indel Realignment GATK

Variant Quality

Cancel Back Next

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

Parameter	Description
Reagent Cartridge Barcode	試薬カードリッジのバーコードにより、MCS が自動的にサンプルシートを検出。
Sample Prep Kit	使用したライブラリー調製キットを選択。
Index Reads	0: indexなし、1: index 1つ(i7)、2: Index 2つ(i7, i5)を選択。
Experiment Name	実験名
Investigator Name	実験者名
Description	詳細
Date	実施日
Read Type	Paired End、あるいはSingle Readを選択
Cycle Read	サイクル数を設定

記載は必須ではない

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

Resequencing Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*

Sample Prep Kit

Index Reads 0 1 2

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

* - required field

Resequencing Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Use Somatic Variant Caller

Flag PCR Duplicates

Reverse Complement

Indel Realignment GATK

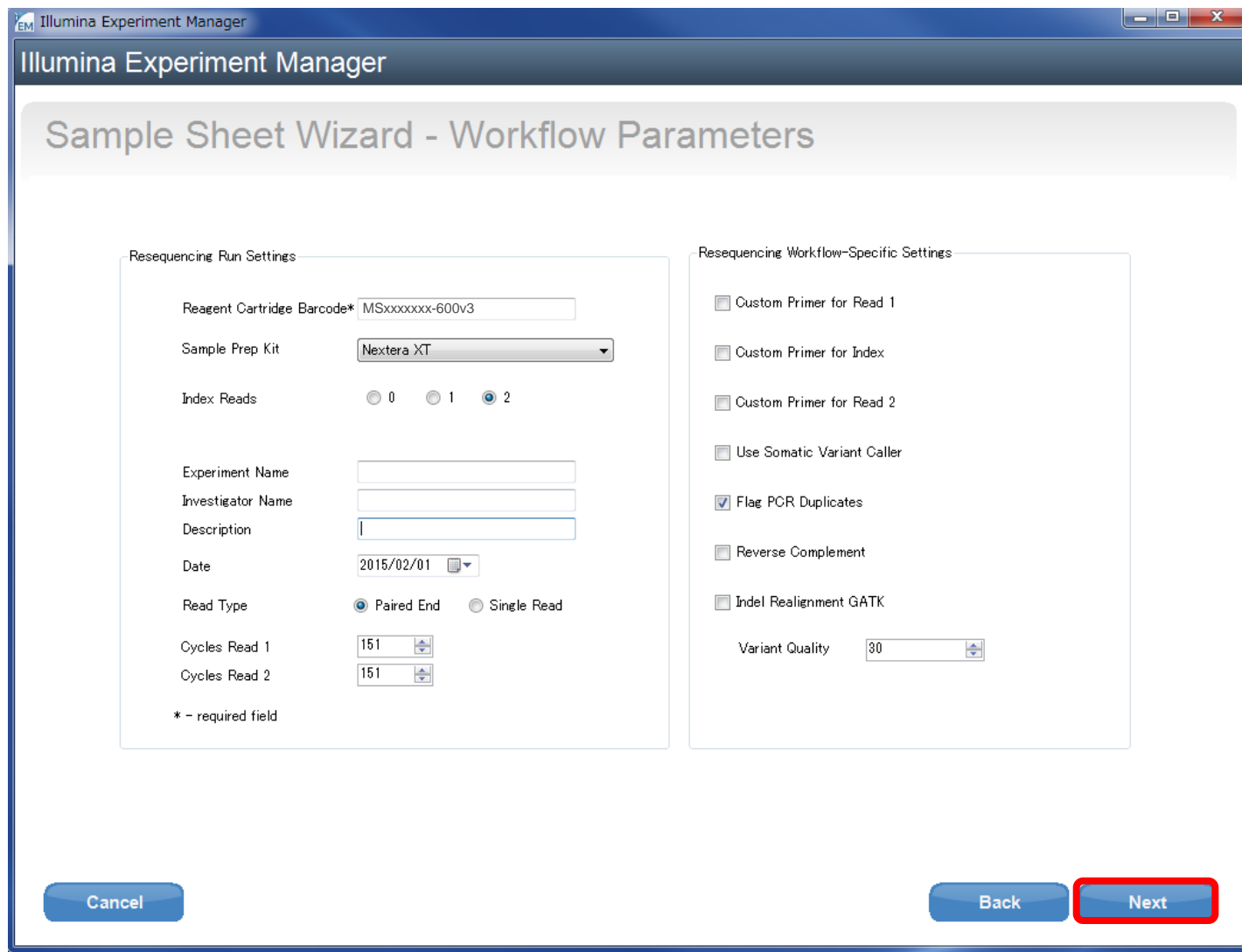
Variant Quality

Cancel Back Next

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

Specific Setting	Description
Custom Primer for Read 1	カスタムプライマーを使用し、MiSeq Reagent Kitの18-20番ポートに分注した場合に選択。
Custom Primer for Index	
Custom Primer for Read 2	
Use Somatic Variant Caller	変異コールツールを使用する場合に選択。下記URLをご確認ください。 http://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_somatic_variant_caller.pdf
Flag PCR Duplicates	デフォルトで選択されている。PCRデュプリケートと認識されたリードにフラグが立ち、そのリードが変異コールに使用されない。
Reverse Complement	Nextera Mate Pair Kitでシーケンスの向きを自動で処理する設定。 http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_mate_pair.pdf
Indel Realignment GATK	シーケンスした領域中に短いIndelがあり、マッピングが難しい部分があった場合、その領域に対してGATKで再アライメントを実施する設定。
Variant Quality	コールされた変異のVariant Quality Scoreが指定した値を下回った場合、その変異にフラグを立てフィルターにかかるようにする設定。デフォルトでは30が設定されている。 MiSeq Reporter User Guide参照 http://support.illumina.com/downloads/miseq_reporter_user_guide_15042295.html

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択



Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

Resequencing Run Settings

Reagent Cartridge Barcode* MSxxxxxx-600v3

Sample Prep Kit Nextera XT

Index Reads 0 1 2

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date 2015/02/01

Read Type Paired End Single Read

Cycles Read 1 151

Cycles Read 2 151

* - required field

Resequencing Workflow-Specific Settings

Custom Primer for Read 1

Custom Primer for Index

Custom Primer for Read 2

Use Somatic Variant Caller

Flag PCR Duplicates

Reverse Complement

Indel Realignment GATK

Variant Quality 30

Cancel Back Next

サンプルシートの作成 – Sample Selection

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	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
1	sample1							
2	sample2							

N701
N702
N703
N704
N705
N706
N707
N708
N709
N710
N711
N712

S501
S502
S503
S504
S505
S506
S507
S508
S517

Add

Sample Sheet Status: Invalid
Reason: Not all samples in this sample sheet have all the required fields

サンプルシートの作成 – Sample Selection

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	Genome Folder*
1	Sample1							Arabidopsis_thaliana#NCBI#build9.1#Sequence#WholeGenomeFasta
2	Sample2							Bos_taurus#Ensembl#UMD3.1#Sequence#WholeGenomeFasta

Escherichia_coli_K_12_DH10B#NCBI#2008-03-17#Sequence#WholeGenomeFasta
Homo_sapiens#UCSC#hg19#Sequence#WholeGenomeFasta
Mus_musculus#UCSC#mm9#Sequence#WholeGenomeFasta
PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta
Rattus_norvegicus#UCSC#rn4#Sequence#WholeGenomeFasta
Saccharomyces_cerevisiae#UCSC#sacCer2#Sequence#WholeGenomeFasta
Staphylococcus_aureus_NCTC_8325#NCBI#2006-02-16#Sequence#WholeGenomeFasta

Sample Sheet Status: **Invalid**
Reason: **Not all samples in this sample sheet have all the required fields**

サンプルシートの作成 – Sample Selection

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	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
1	Sample1			N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC	Homo_sapiens#UCSC#hg19#Sequen
2	Sample2			N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT	Homo_sapiens#UCSC#hg19#Sequen

Sample Sheet Status: **Valid**
Reason:

Cancel **Finish** → 終了 Back **Finish**

サンプルシートの作成 – Finish

保存先



The screenshot shows the 'Illumina MiSeq' software window. At the top, there is a green checkmark icon and a question mark icon. Below them is a text box that says 'Please make any needed changes to the Folders.' The main area contains four rows of folder selection fields, each with a 'Browse...' button to its right:

- Recipe Folder: D:\Illumina\MiSeq Control Software\CustomRecipe
- Sample Sheet Folder: D:\Illumina\MiSeq Control Software\SampleSheets (highlighted with a red box)
- Manifest Folder: D:\Illumina\MiSeq Control Software\Manifests
- Output Folder: D:\Illumina\MiSeqOutput

At the bottom of the window, there are two large buttons: 'Back' on the left and 'Save and Continue' on the right. The Windows taskbar is visible at the very bottom, showing system icons and a temperature display.

エクセルで確認可能

The screenshot shows a dialog box titled 'Illumina Experiment Manager' with a subtitle 'Sample Sheet Wizard - Review'. The main text inside the dialog asks: 'Would you like to view your sample sheet in Excel?'. At the bottom of the dialog, there are two buttons: 'Yes' and 'No'.

サンプルシートの例

[Header]												
IEMFileVersion									4			
Date									#####			
Workflow									Resequencing			
Application									Resequencing			
Assay									Nextera XT			
Description									Amplicon			
Chemistry												
[Reads]												
									151			
									151			
[Settings]												
FlagPCRDuplicates									1			
ReverseComplement									0			
VariantFilterQualityCutoff									30			
outputgenomevcf									FALSE			
Adapter									CTGTCTCTTATACATCT			
[Data]												
Sample_ID	Sample_Na	Sample_Pla	Sample_We	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	GenomeFo	Sample_Prc	Description		
1	Sample1			N701	TAAGGCG.S501	TAGATCG		Homo_sapiens	UCSC	hg19	Sequence	WholeGenomeFasta
2	Sample2			N702	CGTACTA(S502	CTCTCTA		Homo_sapiens	UCSC	hg19	Sequence	WholeGenomeFasta

禁忌文字
? () [] / ¥ = + < > : ; “ ” , * ^ | & . とスペース、全角文字

インデックスの組み合わせ

- ▶ IEM1.6まではインデックスの組み合わせをチェックする機能がありました。

Sample Sheet Status: **Warning**

Reason: There is not enough diversity in the index cycles. Every cycle in the index reads must have at least one base in the green channel (G,T) and one in the red channel (A,C) to ensure proper image processing

Indexのカラーバランスが悪いとwarningが出る

- ▶ IEM1.7以降ではこの機能が省略されています。

Sample Sheet Status: **Valid**

Reason:

- ▶ インデックスの組み合わせが悪いとIndex Readでオーバークラスターになりやすくなったり、振り分けが通常よりうまくいかなることがあります。
下記資料を参照して組み合わせに留意をお願いいたします。

TruSeq Library Pooling Guide

<http://support.illumina.com/downloads/truseq-library-prep-pooling-guide-15042173.html>

Nextera Low Pooling Guidelines

http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_nextera_low_plex_pooling_guidelines.pdf

カスタムで作製したインデックス配列を入力したい



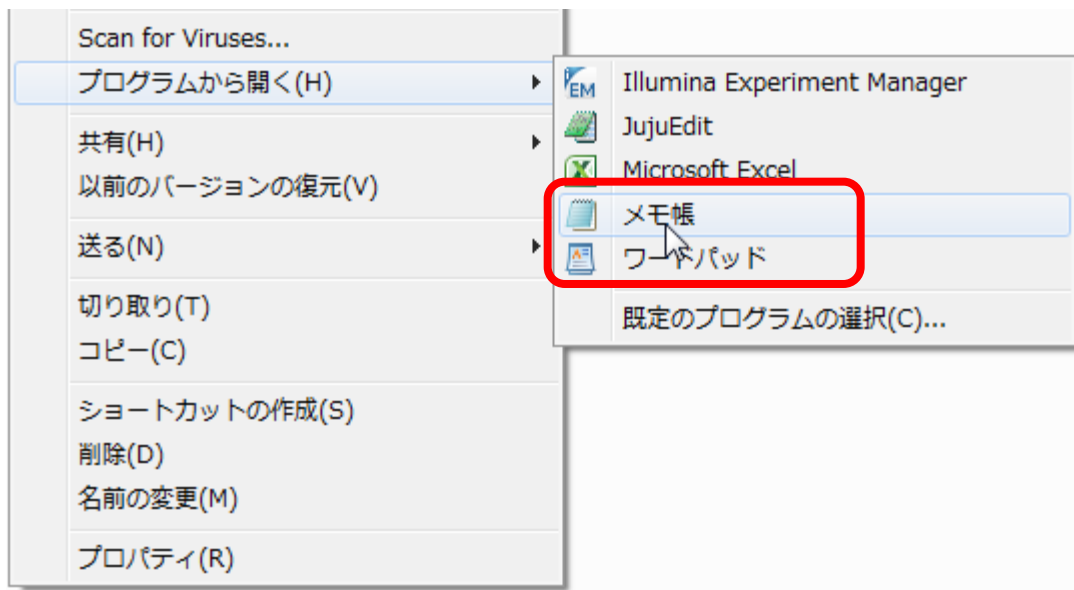
それぞれのIndexは上記の方向で5'→3'の向きに解析される。
解析に合わせた方向での入力が必要。

弊社のキットでライブラリーを作製された場合は、すべてデフォルトで対応しています。

カスタムで作製したインデックス配列を入力したい →サンプルシートをマニュアルで修正する

[ポイント！]

一度作成したサンプルシートを「メモ帳」か「ワードパッド」などのテキストエディターで開く。
Excelで開くと”,”などが挿入されてしまうことがあるので避ける。



カスタムで作製したインデックス配列を入力したい →サンプルシートをマニュアルで修正する

```
[Header]
IEMFileVersion,4
Investigator Name,Takafumi Kobayashi
Experiment Name,S288C Whole Genome Seq
Date,2015/02/17
Workflow,GenerateFASTQ
Application,FASTQ Only
Assay,TruSeq HT
Description,
Chemistry,Amplicon

[Reads]
151
151

[Settings]
ReverseComplement,0
Adapter,AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
AdapterRead2,AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

[Data]
Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,I5
_Index_ID,index2,Sample_Project,Description
S288C,,,,D701,ATTACTCG,D502,ATAGAGGC,,
```

配列の方向に
気を付ける！

「ワードパッド」上でインデックス配列のみ修正して保存する。
インデックスの名前の修正は必要ではありません。

MiSeqからのサンプルシートの利用

- ▶ **ランの準備** : サンプルシートをMiSeq のPC上へ
MiSeq Control Software (MCS) で指定
- ▶ **ランの開始** : ランフォルダーのルートへコピー
- ▶ **ランの終了** : サンプルシートはMiSeq Reporterによる二次解析へ

Additional Information

- ▶ **Illumina Experiment Manager Guide**

http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager.html

- ▶ **MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide**

http://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html

- ▶ **MiSeq System User Guide**

http://support.illumina.com/downloads/miseq_system_user_guide_15027617.html

サンプルシート作成 – Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection



MiSeq



HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA

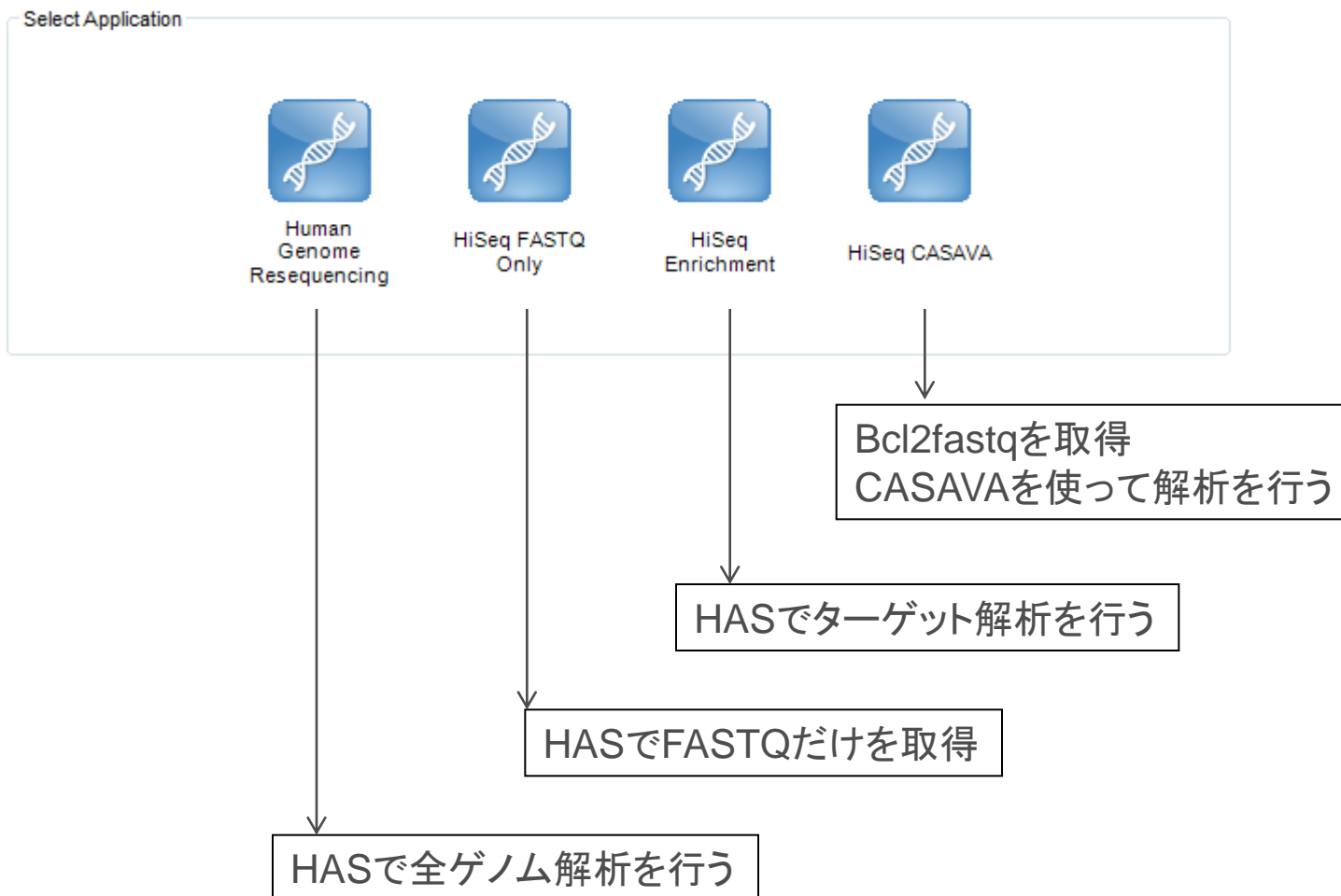


NextSeq

Cancel

Next

サンプルシートの作成 – Select Application



HiSeq CASAVAでつくるFASTQ

サポートウェビナーシリーズ2013

2013/10/11

「CASAVAでつくるFASTQ -- HiSeq/MiSeqのデータをLinuxでdemultiplex (single/dual)」



Advances in
Genome Science.

テクニカルサポートウェビナー 2013/10/11

「CASAVAでつくるFASTQ」

Eri Kibukawa
Bioinformatics Support Scientist
Illumina APAC

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.
Biology, Biotechnology, Bioinformatics, Bioinformatics, Life Sciences, Computing, Data, Genomics, Energy, Genome Analysis, Genomics, Health, Microarrays, Sequencing, Systems, and Life Sciences. Illumina, Inc. and the Illumina logo are trademarks of Illumina, Inc. All other marks and names contained herein are the property of their respective owners.



イルミナサポートウェビナー(http://www.illumina.com/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss)

サンプルシート の作成 – Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection



MiSeq



HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA

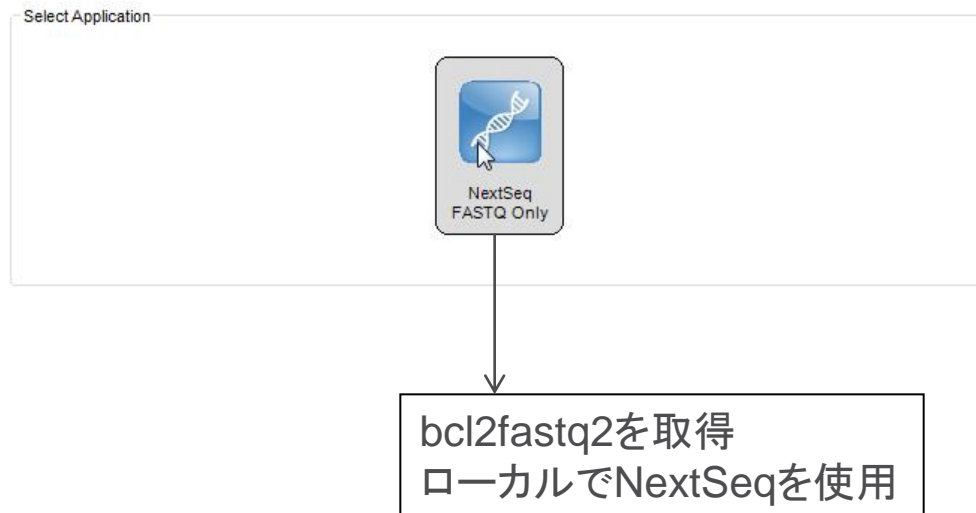


NextSeq

Cancel

Next

サンプルシートの作成 – Select Application



NextSeq 500から得られるデータのFASTQ変換

サポートウェビナーシリーズ2014

2014/11/14

「NextSeq 500から得られるデータのFASTQ変換」



2014年11月14日
サポートウェビナー

NextSeq 500から得られる
データのFASTQ変換
- bcl2fastq バージョン2 ほか

イルミナ株式会社
バイオインフォマティクス
サポートサイエンティスト
突生川絵里 (Eri Kibukawa)

illumina

イルミナサポートウェビナー(http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss)

Summary

- ▶ IEMはサンプルシートを作成するソフトウェア。
- ▶ サンプルシートはラン条件の設定や解析の条件を指定する。
- ▶ サンプルシートの作成は、ウィザードベースで行うことができ、必要に応じて修正することが可能。

サポートウェビナーにご参加いただき ありがとうございました。

本日のセッション終了後のご質問は、
techsupport@illumina.com
で承ります。

テクニカルサポート直通のフリーダイヤルも
ご利用くださいませ。

[0800-111-5011](tel:0800-111-5011)