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 サイエンティスト

© 2014 Illumina, Inc. All rights reserved.Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAIIx, 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/orother 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®

Illumina Experiment Maneger 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

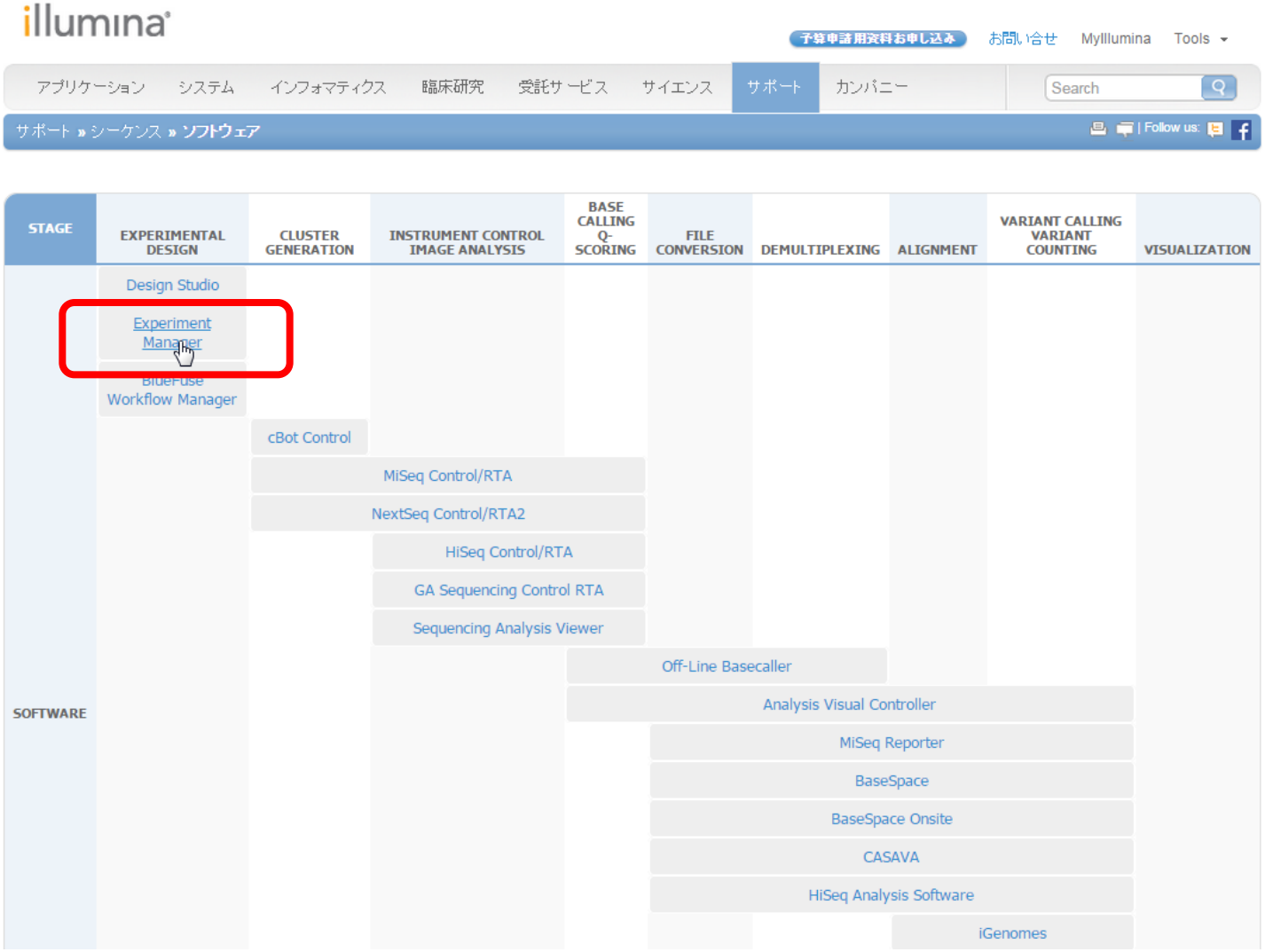
illumina®

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.illuminakk.co.jp/からサポート→シーケンサー・ソフトウェアを選択

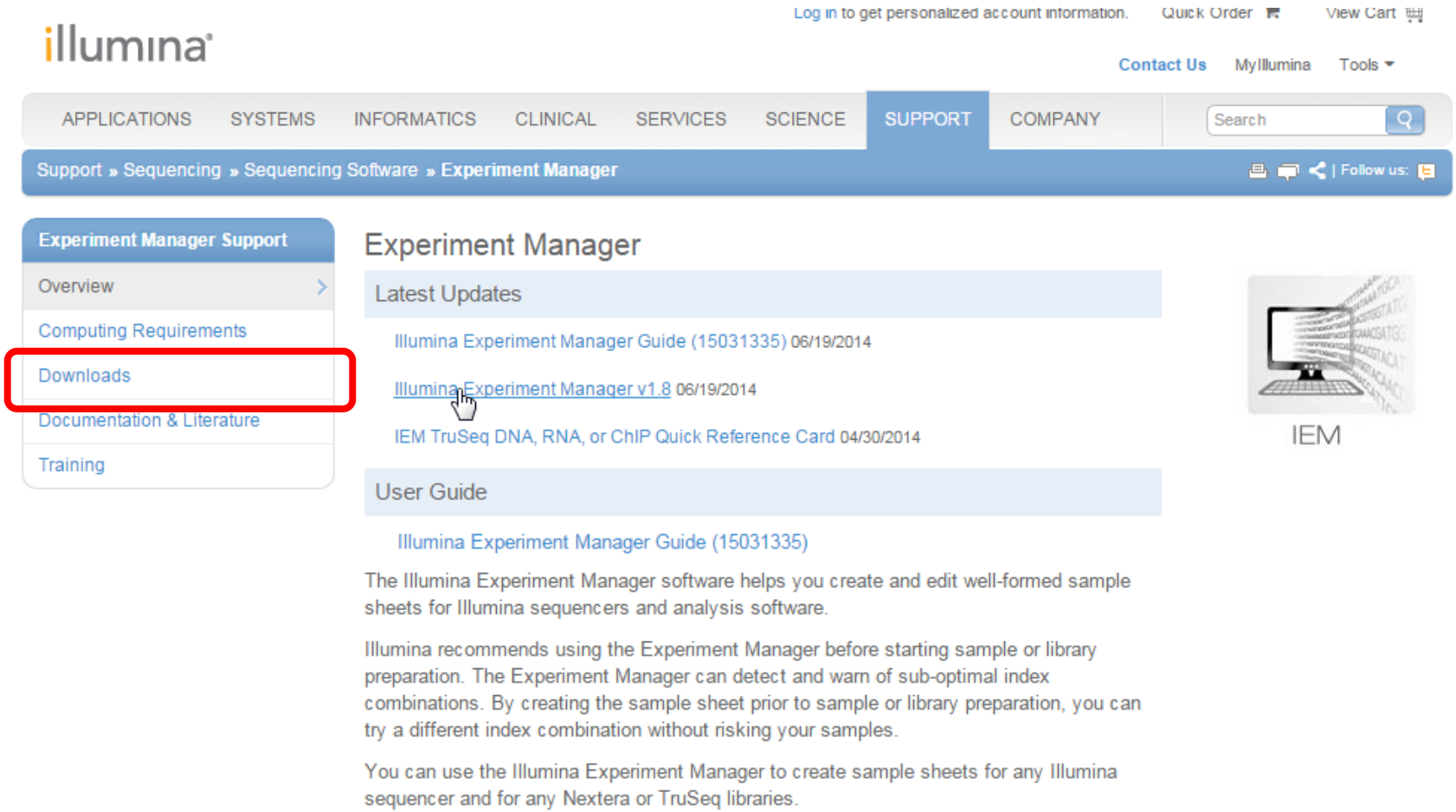
IEMのインストール

② Experiment Managerを選択



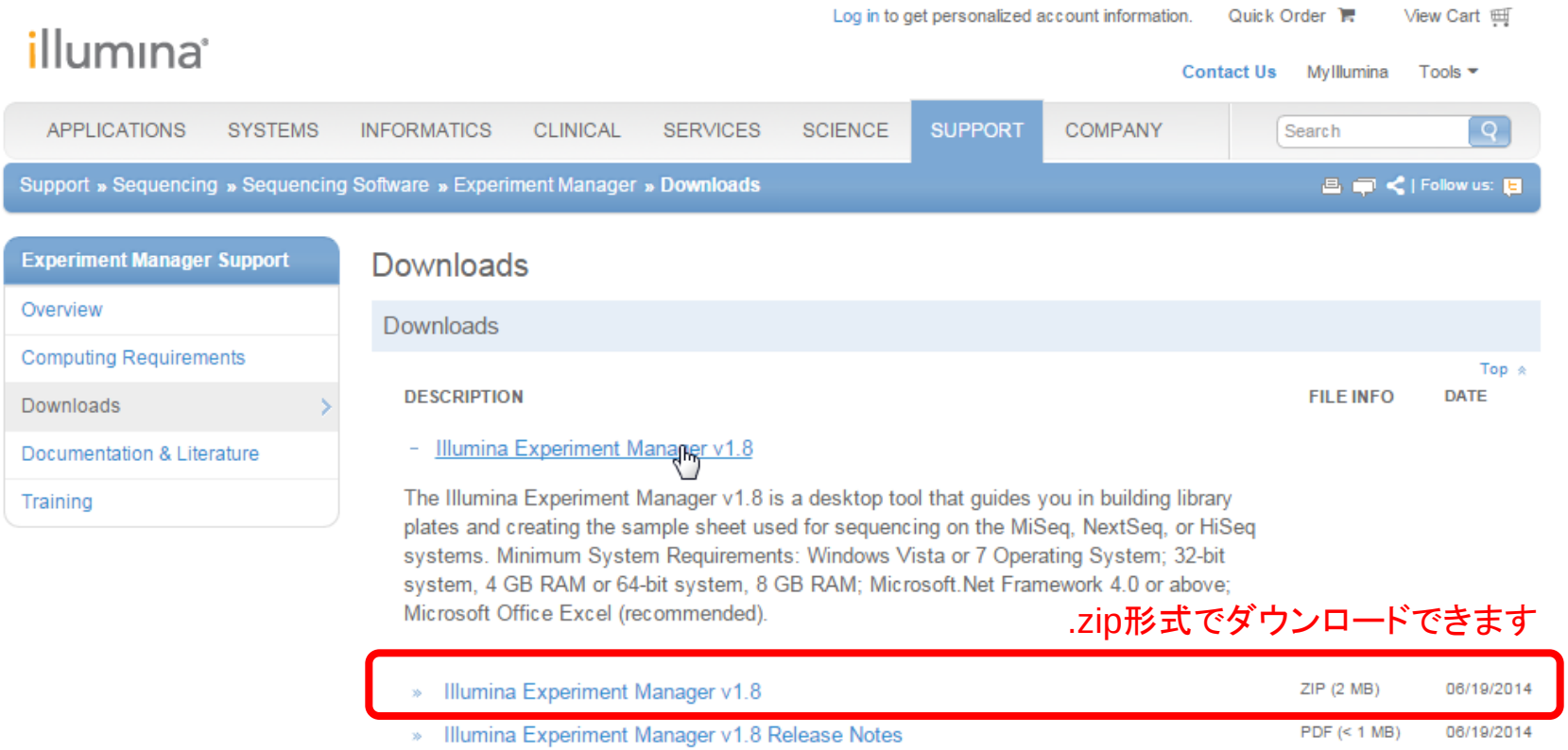
IEMのインストール

③ ダウンロードを選択



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）



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

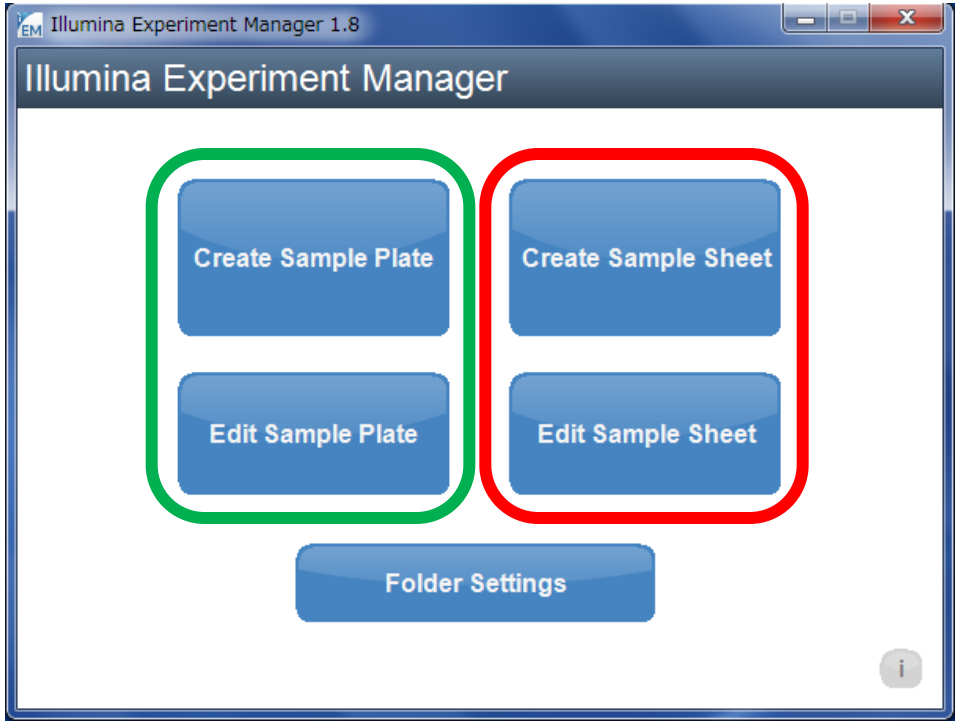
- Setup.exe ファイルを開けてインストール
- インストレーションウィザードに従ってNextを選択

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？

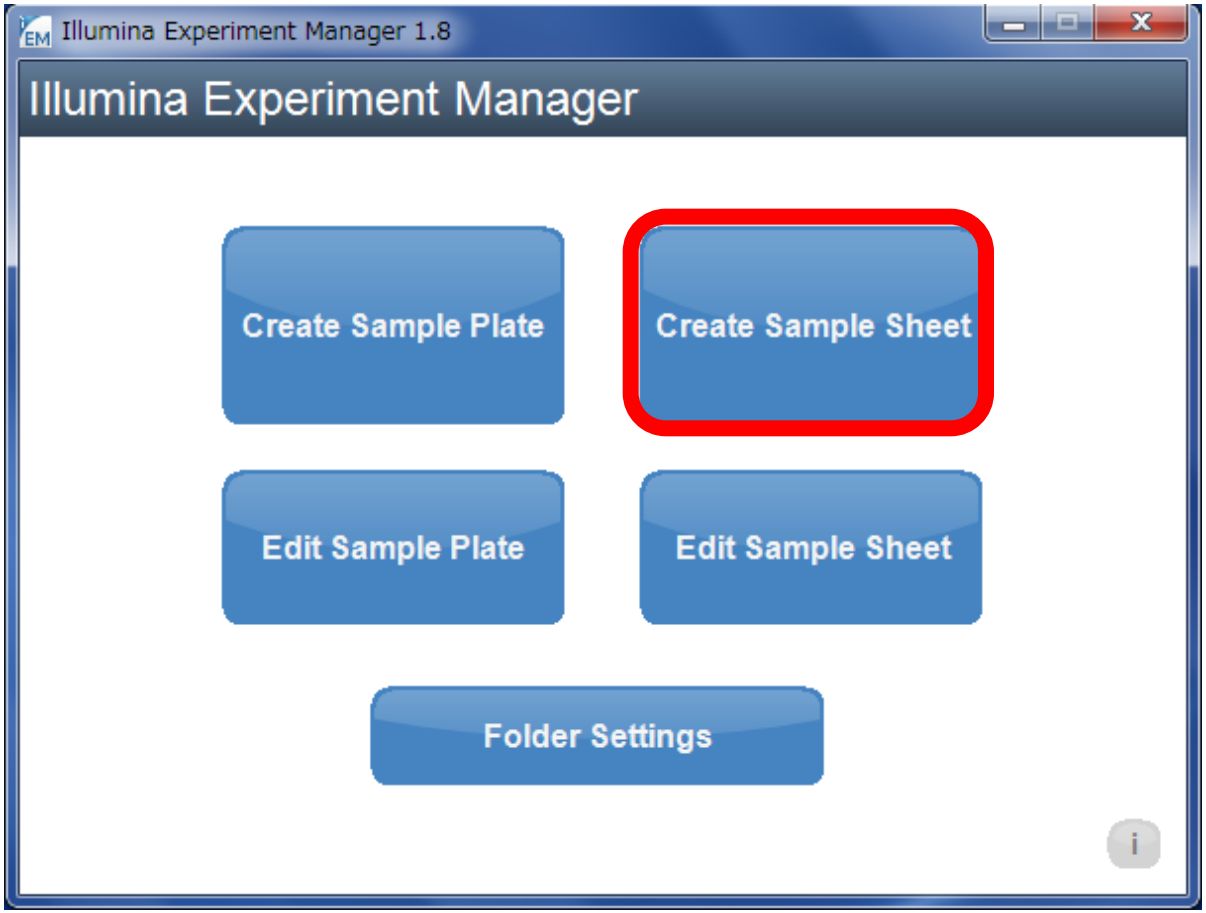
- **サンプルシート:　(.csv)**
  - –ランの条件
  - –データ解析の条件
  - –マニフェスト
  - –参照ゲノム配列



- **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


Illumina Experiment Manager 1.8
Illumina Experiment Manager
Create Sample Plate
Create Sample Sheet
Edit Sample Plate
Edit Sample Sheet
Folder Settings
i

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

illumina®

サンプルシートの作成　– Instrument Selection

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Instrument Selection

1

MiSeq

2

HiSeq 2500/2000/1000
HiScanSQ
GA

3

NextSeq

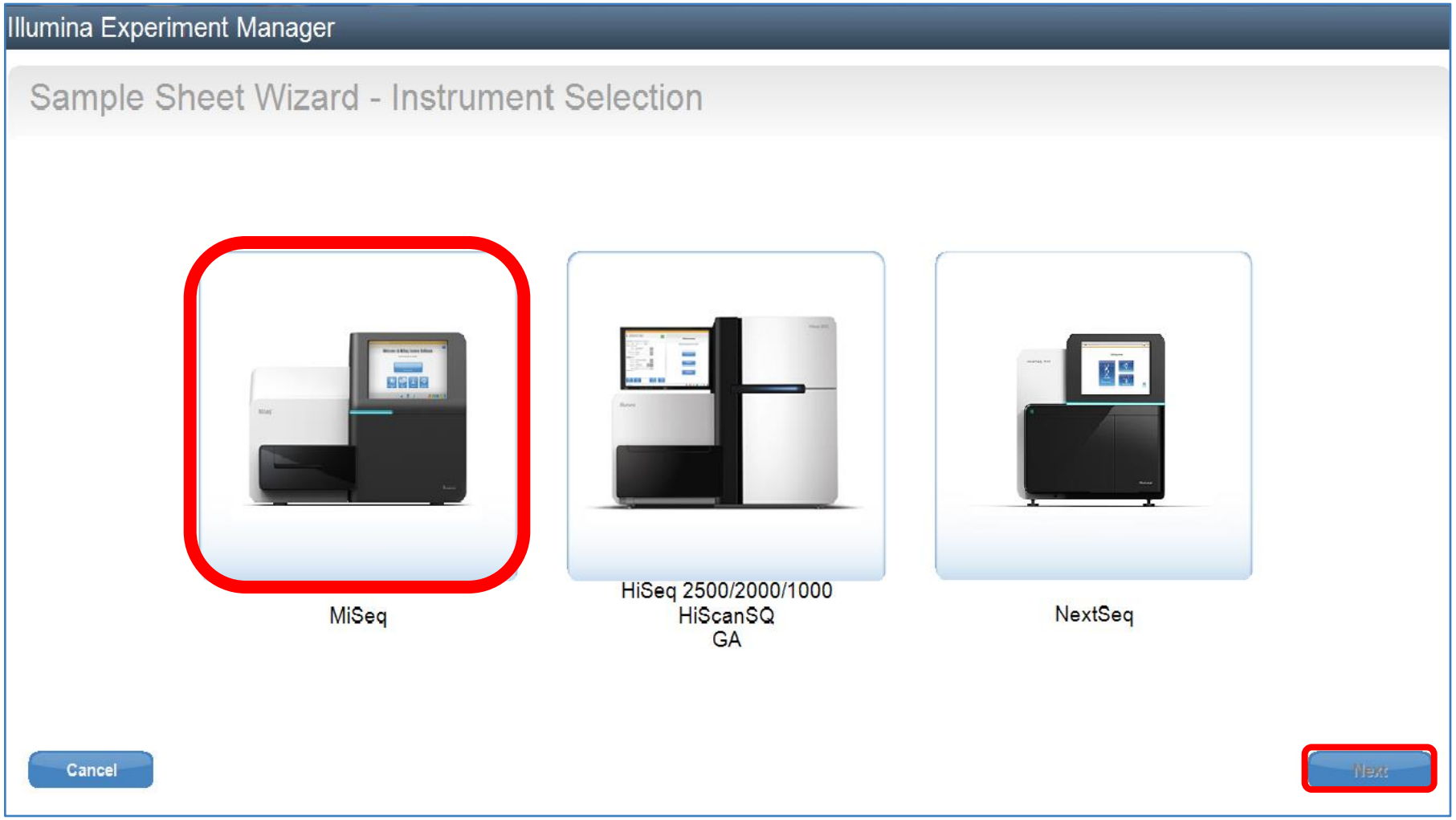
MiSeqに対応する
サンプルシートの作成

HCS/CASAVA
に準拠した
サンプルシート作成

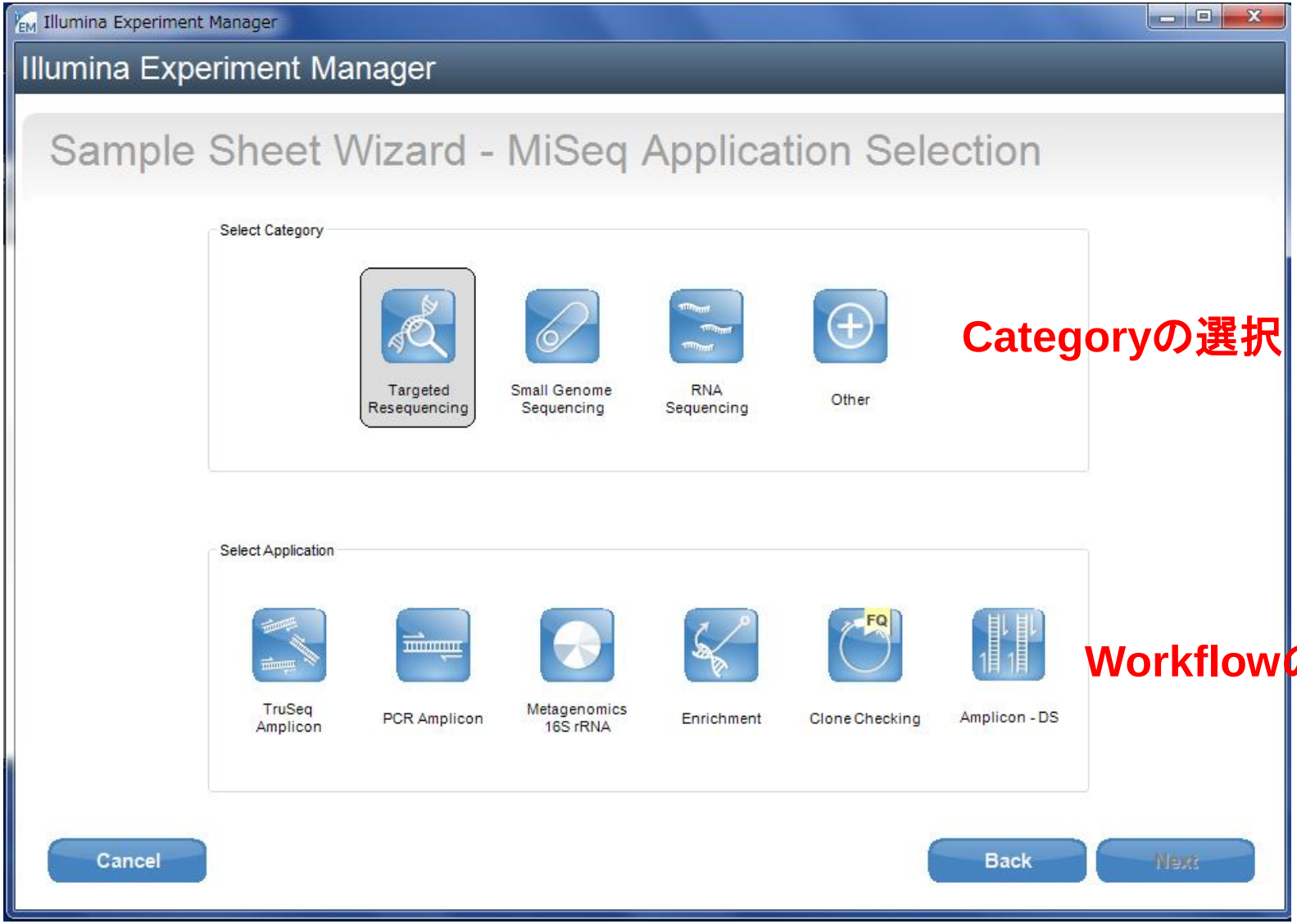
NextSeq500に対応する
サンプルシートの作成

illumina®

サンプルシートの作成　– Instrument Selection



サンプルシートの作成

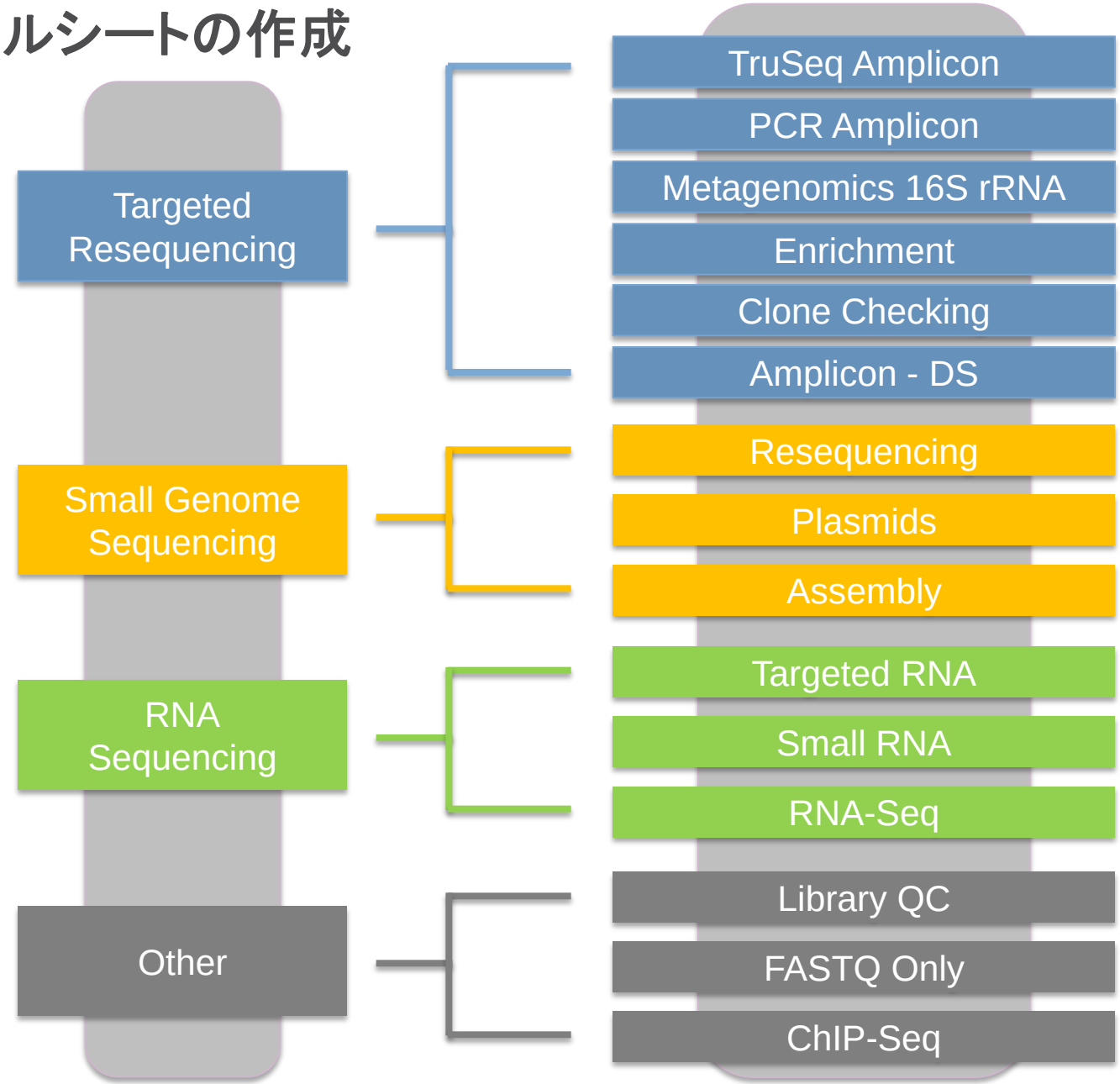


Categoryの選択

Workflowの選択

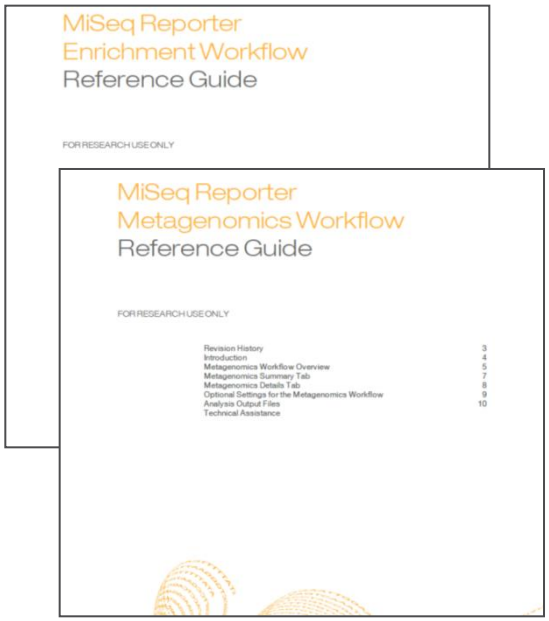
illumina®

サンプルシートの作成



illumina®

MiSeq Reporterについて

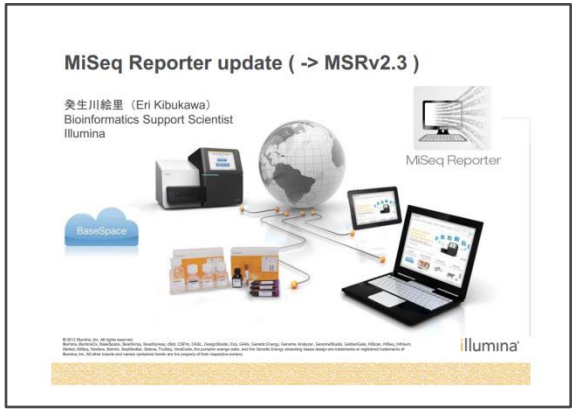


Reference Guide

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

MiSeq Reporter Theory of Operation

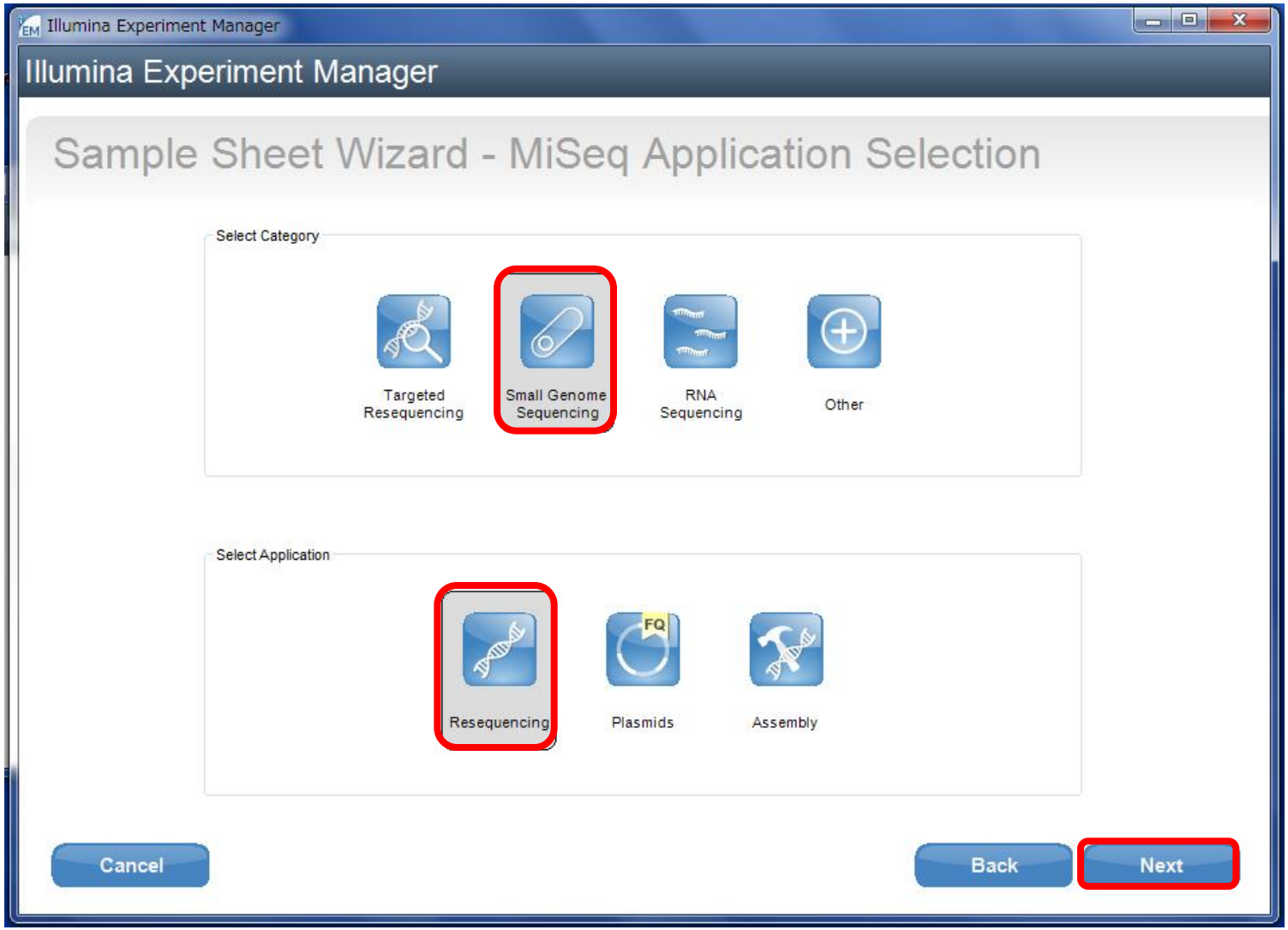
http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/miseq_reporter/documentation.ilmn



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

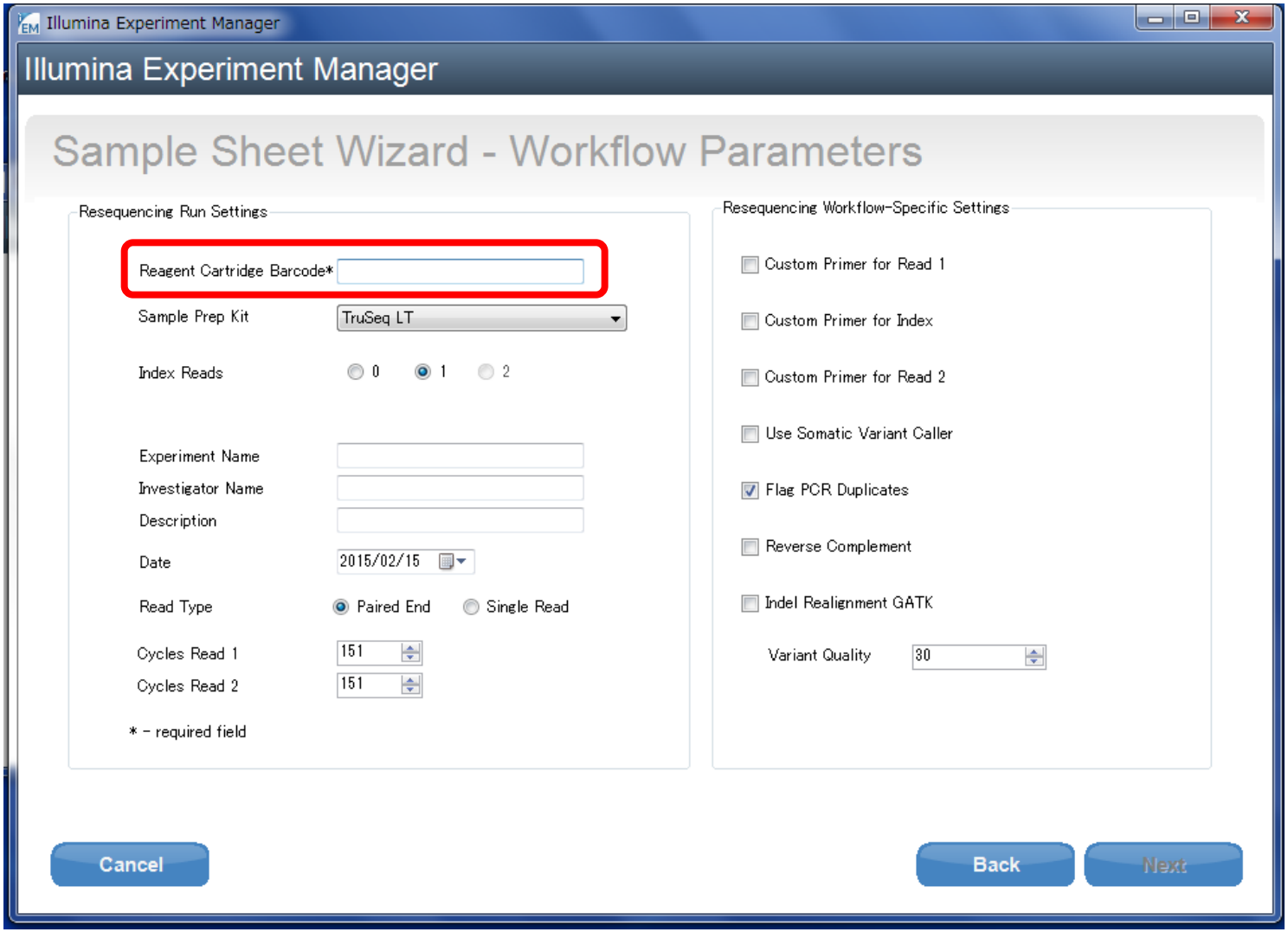
http://www.illuminakk.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss

サンプルシートの作成 – Application Selectionの選択



illumina®

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択



illumina

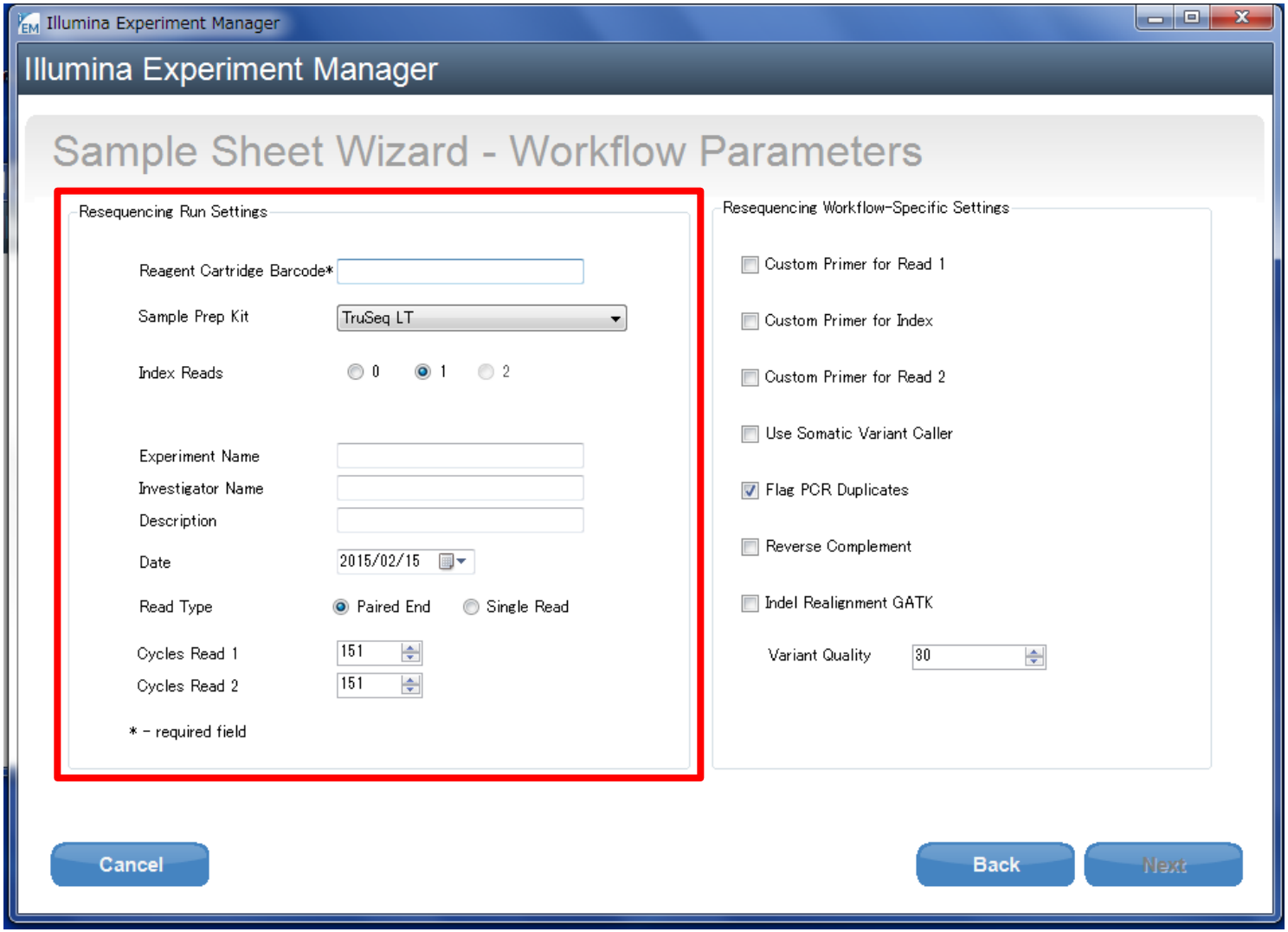
サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

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

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

※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



illumina®

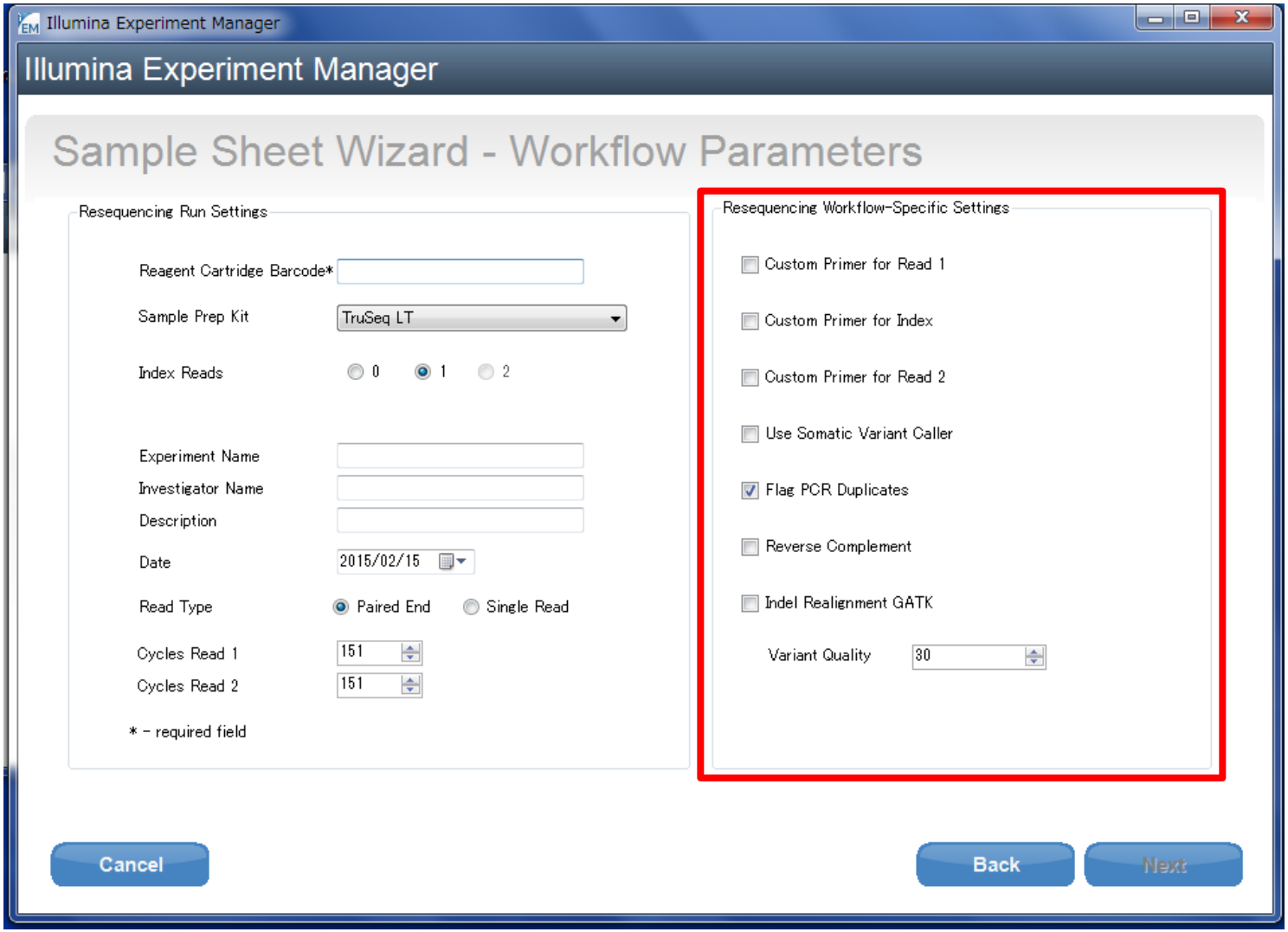
サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

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

illumina®

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

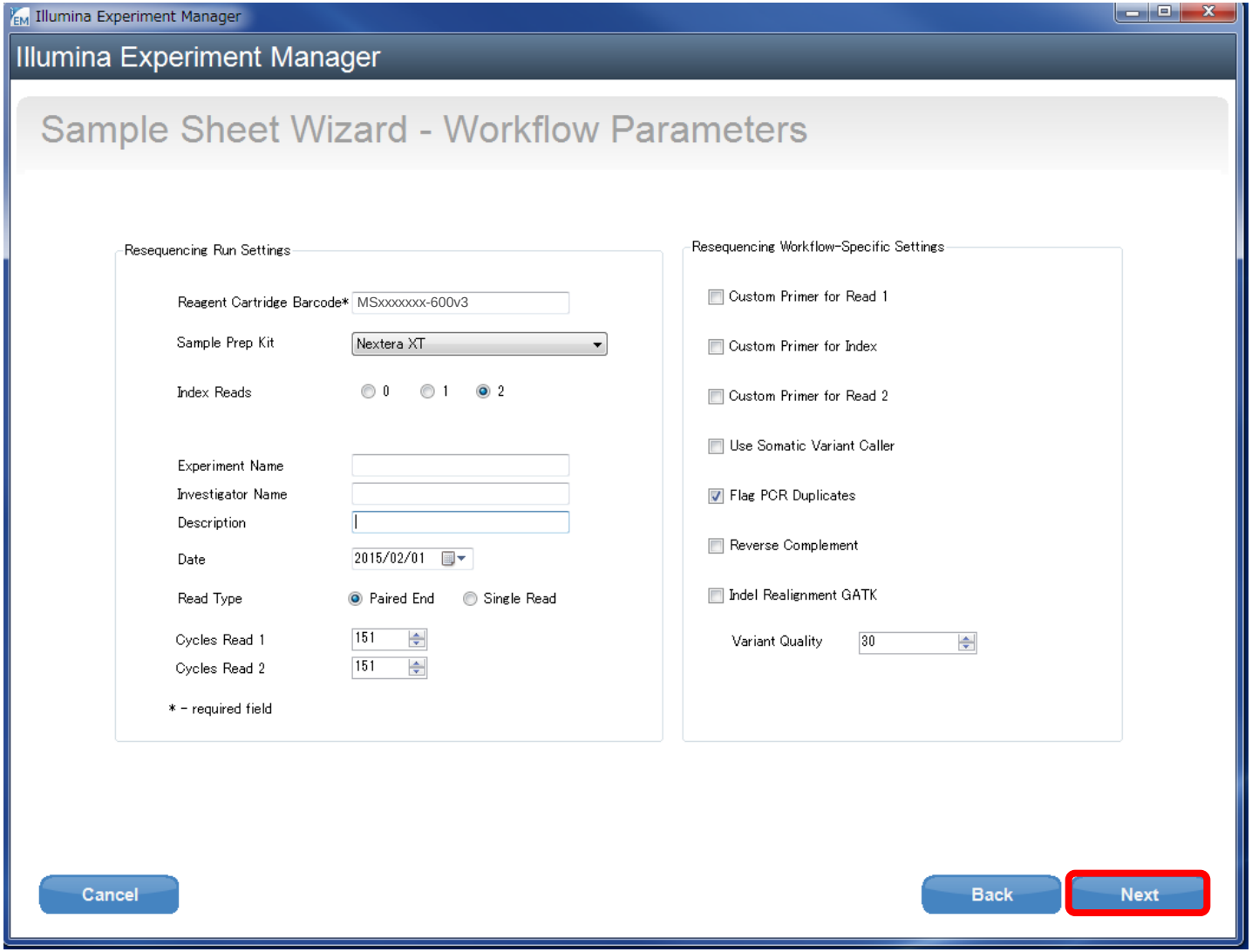


illumina®

サンプルシートの作成 – Workflow Parametersの選択

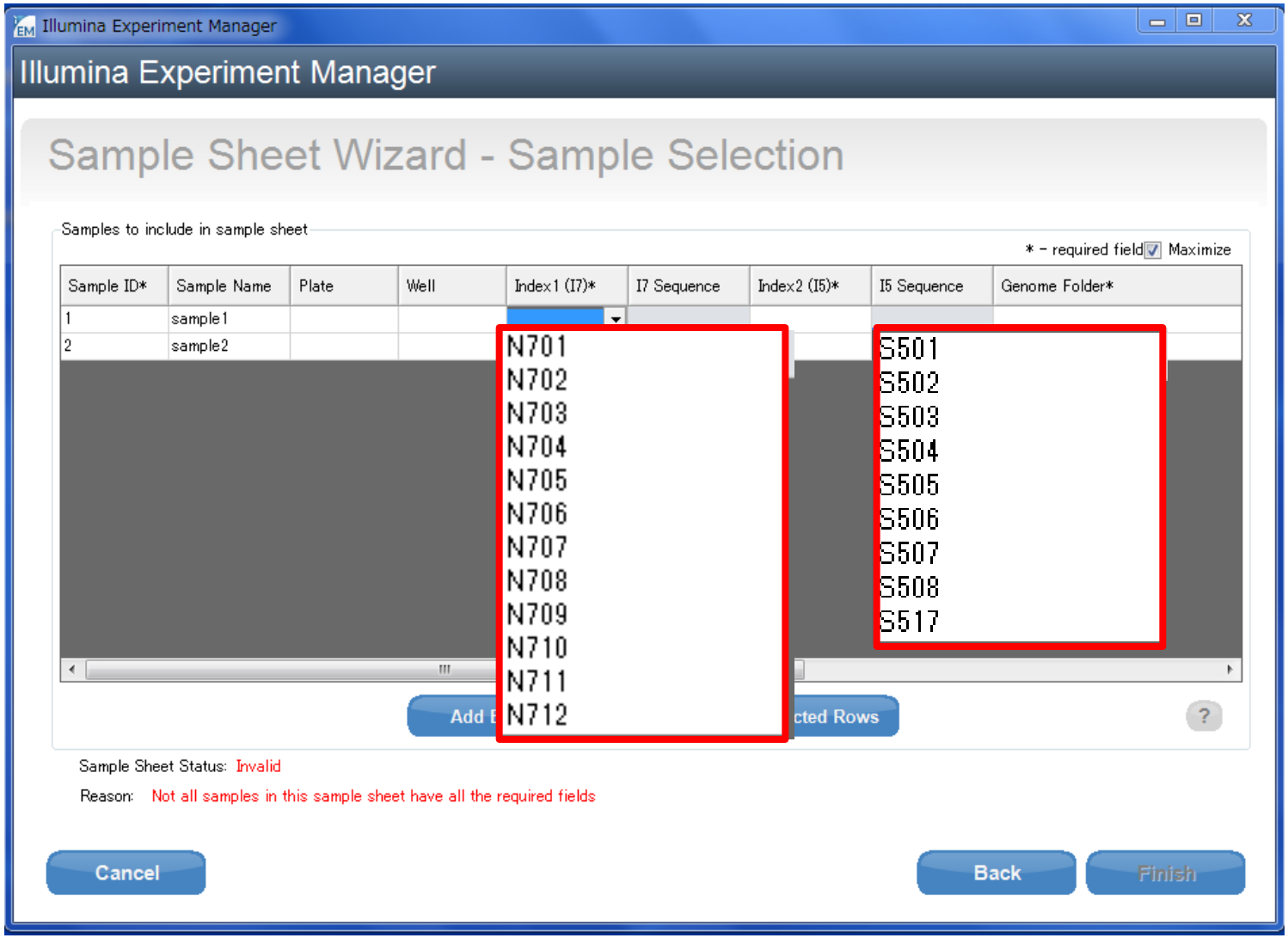
Specific Setting	Description
Custom Primer for Read 1	カスタムプライマーを使用し、MiSeq Reagent Kitの18-20番ポートに分注した場合に選択。
Custom Primer for Index	
Custom Primer for Read 2	
Use Somatic Variant Caller	変異コールツールを使用する場合に選択。下記URLをご確認ください。http://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_somatic_variant_caller.pdf
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 – Wakrflow Parametersの選択



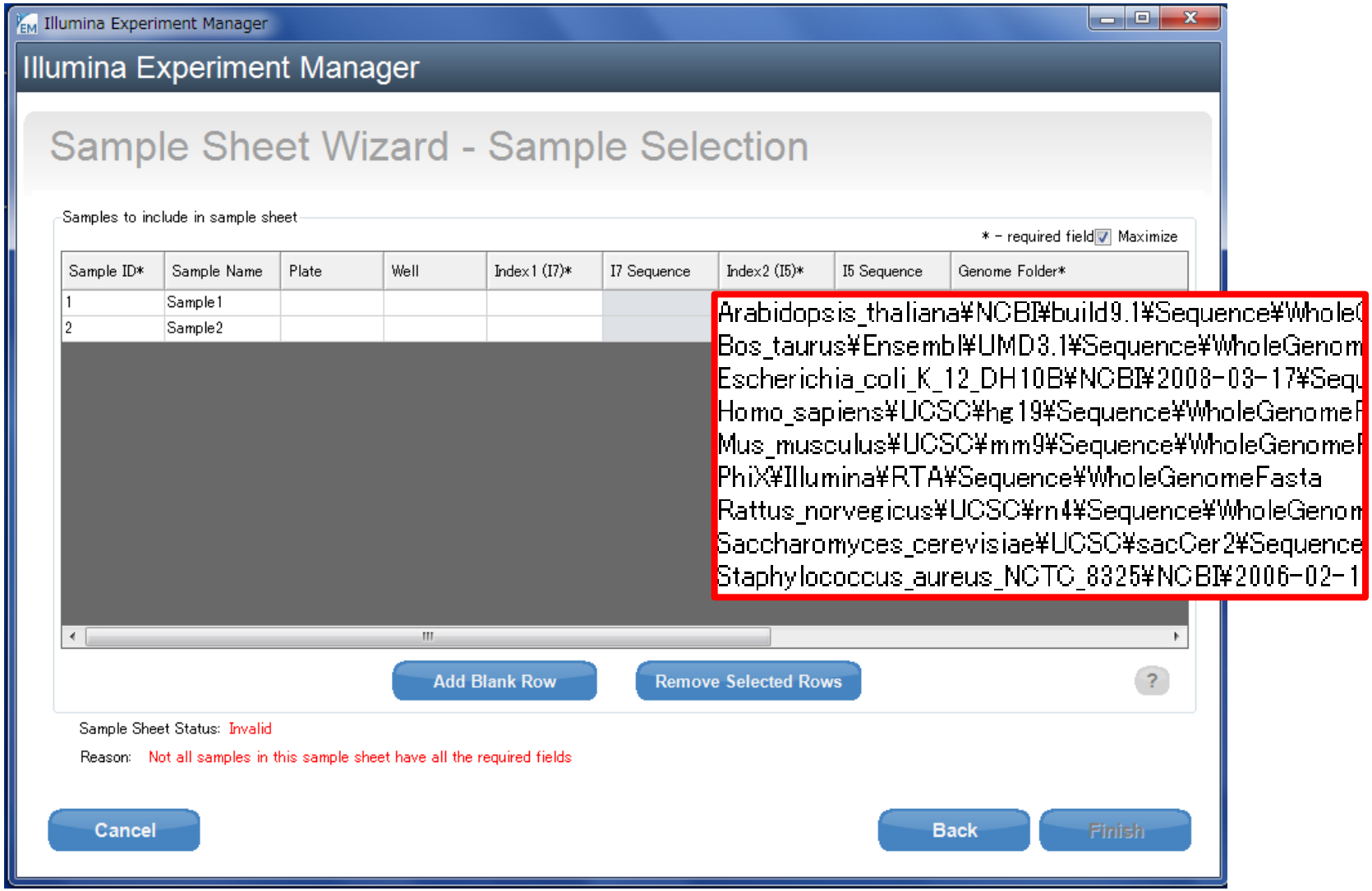
illumina®

サンプルシートの作成 – Sample Selection



illumina®

サンプルシートの作成 – Sample Selection



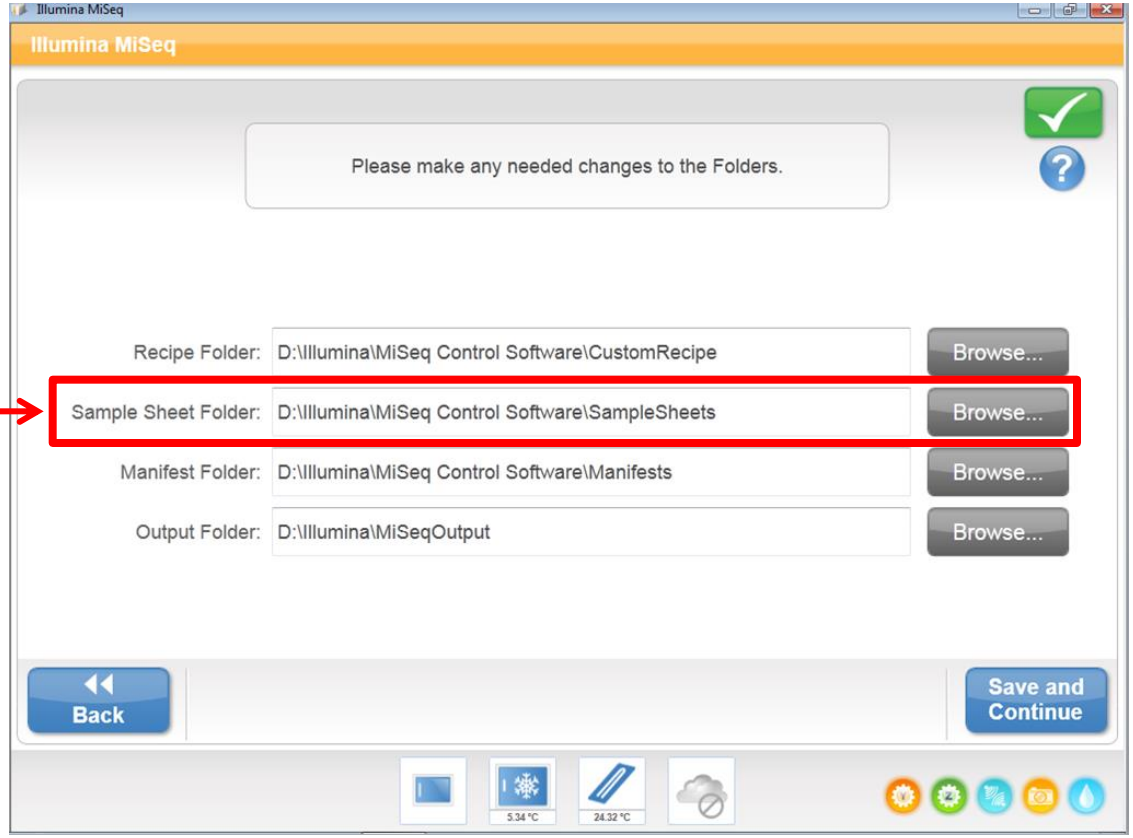
illumina

サンプルシートの作成 – Sample Selection

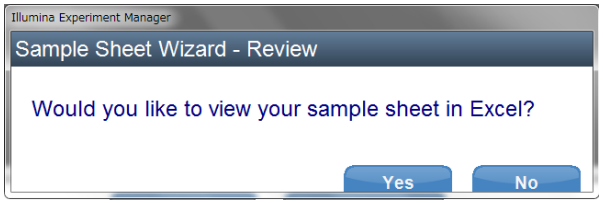
illumina®

サンプルシートの作成　– Finish

保存先



エクセルで確認可能



サンプルシートの例

[Header]										
IEMFileVersion	4									
Date	########									
Workflow	Resequencing									
Application	Resequencing									
Assay	Nextera XT									
Description										
Chemistry	Amplicon									
[Reads]										
151										
151										
[Settings]										
FlagPCRDuplicates	1									
ReverseComplement	0									
VariantFilterQualityCutoff	30									
outputgenomevcf	FALSE									
Adapter	CTGTCTCTTATACACATCT									
[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

illumina®

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。

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。

- 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く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

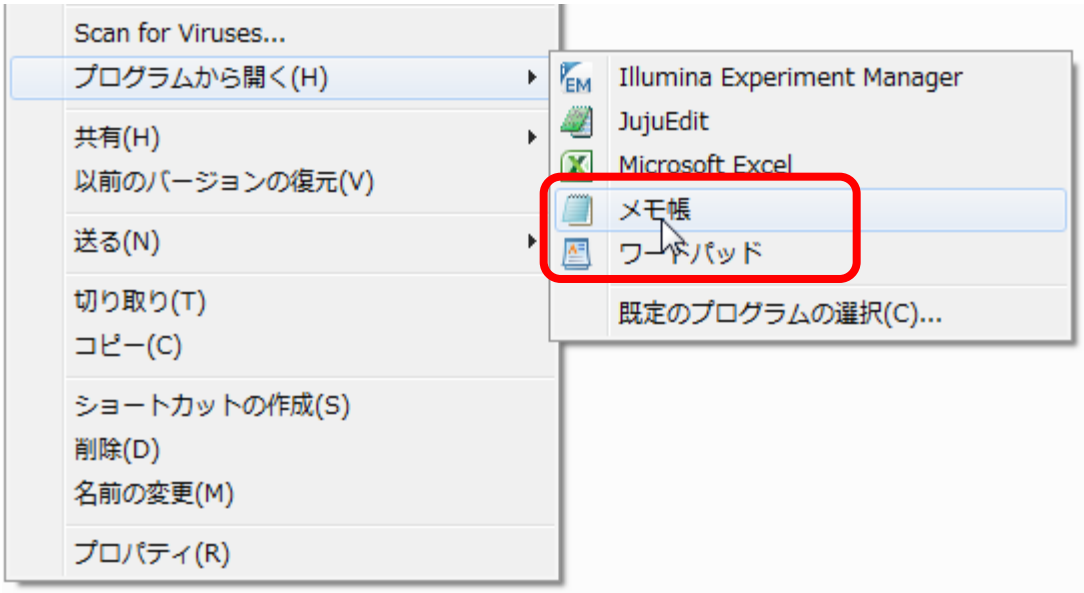
カスタムで作製したインデックス配列を入力したい

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。

illumina®

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

illumina®

Additional Information

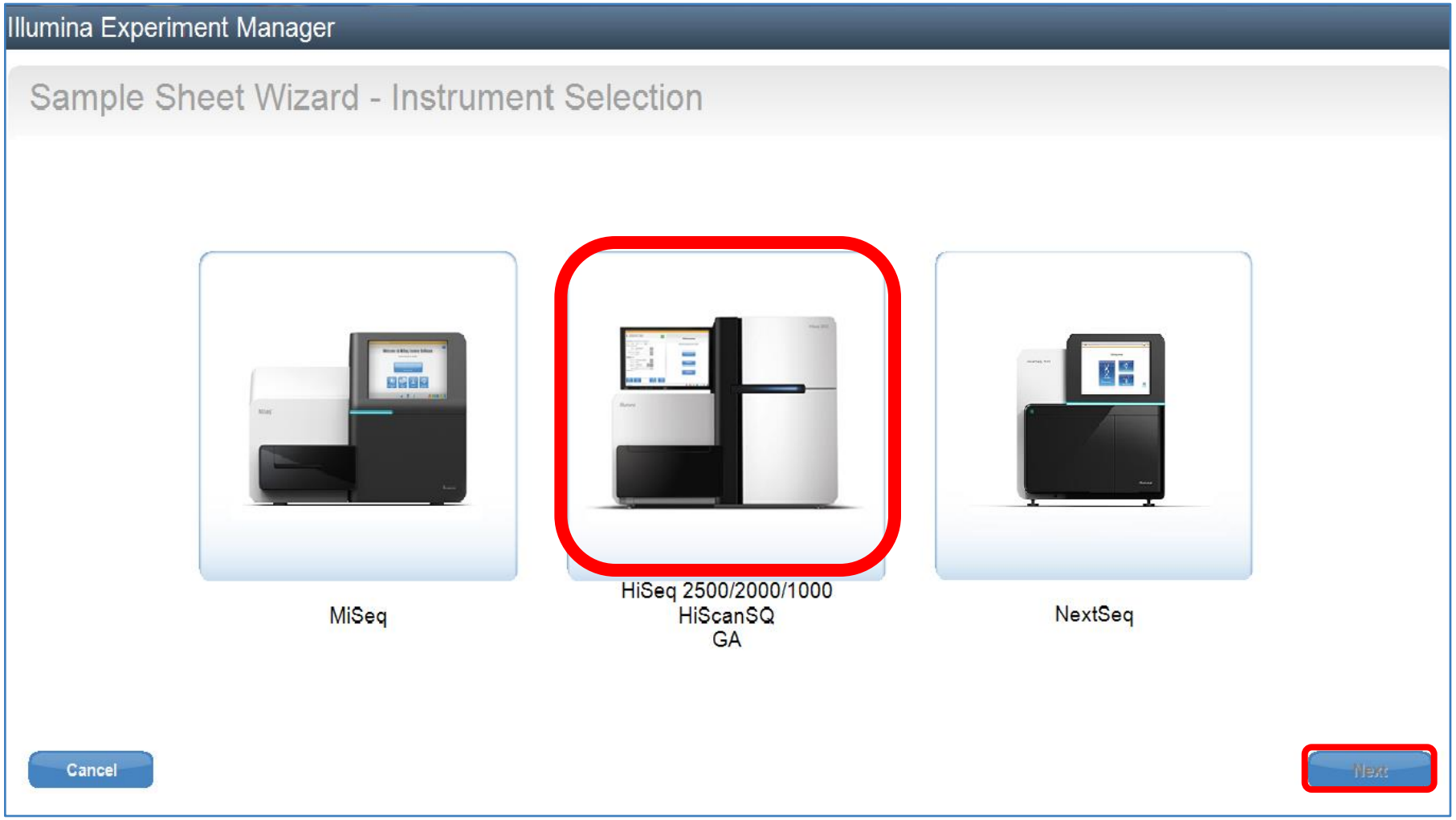
- **Illumina Experiment Manager Guide**
  http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager.html

- **MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide**
  http://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html

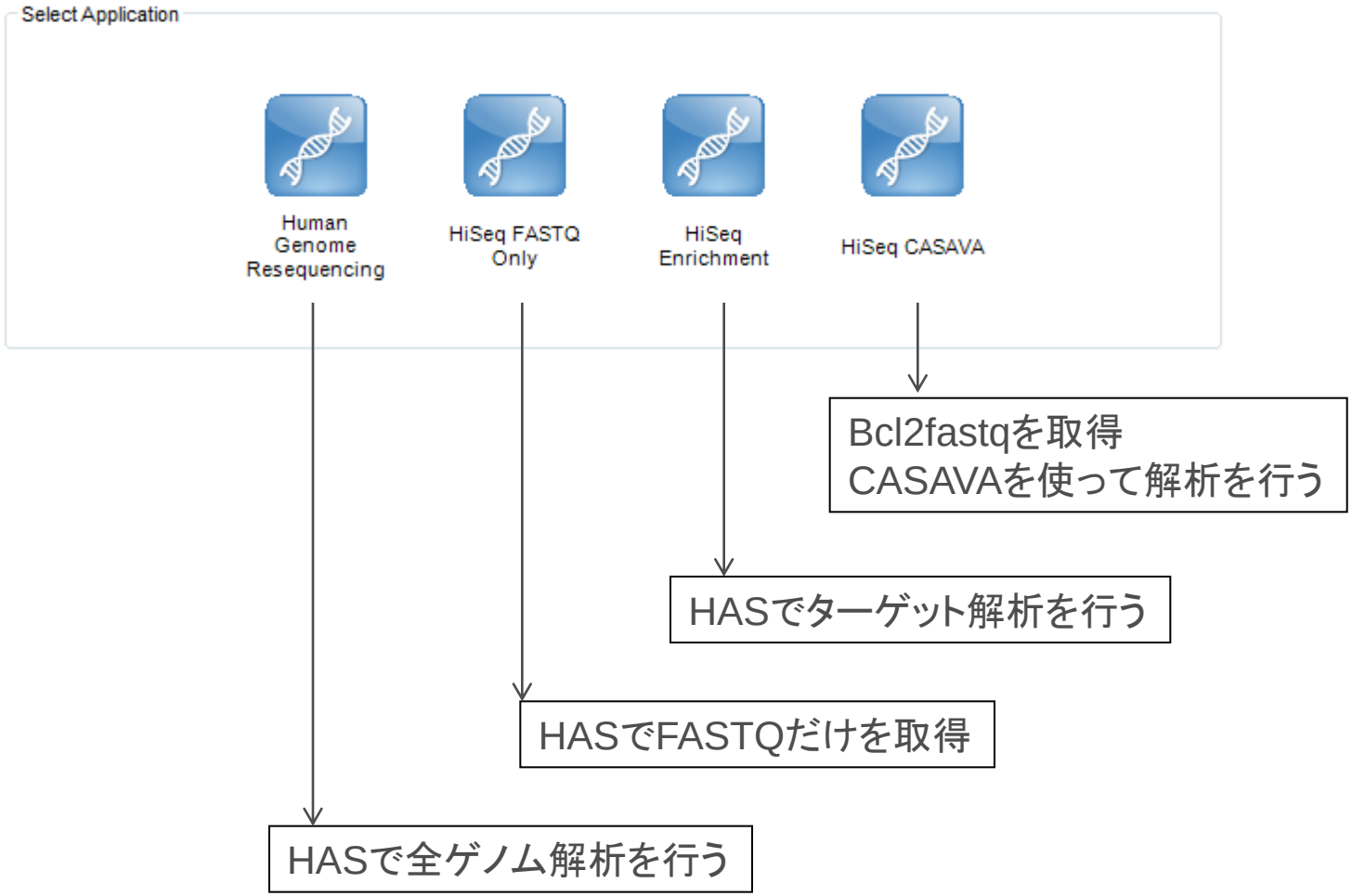
- **MiSeq System User Guide**
  http://support.illumina.com/downloads/miseq_system_user_guide_15027617.html

illumina®

サンプルシートの作成　– Instrument Selection



サンプルシートの作成　– Select Application



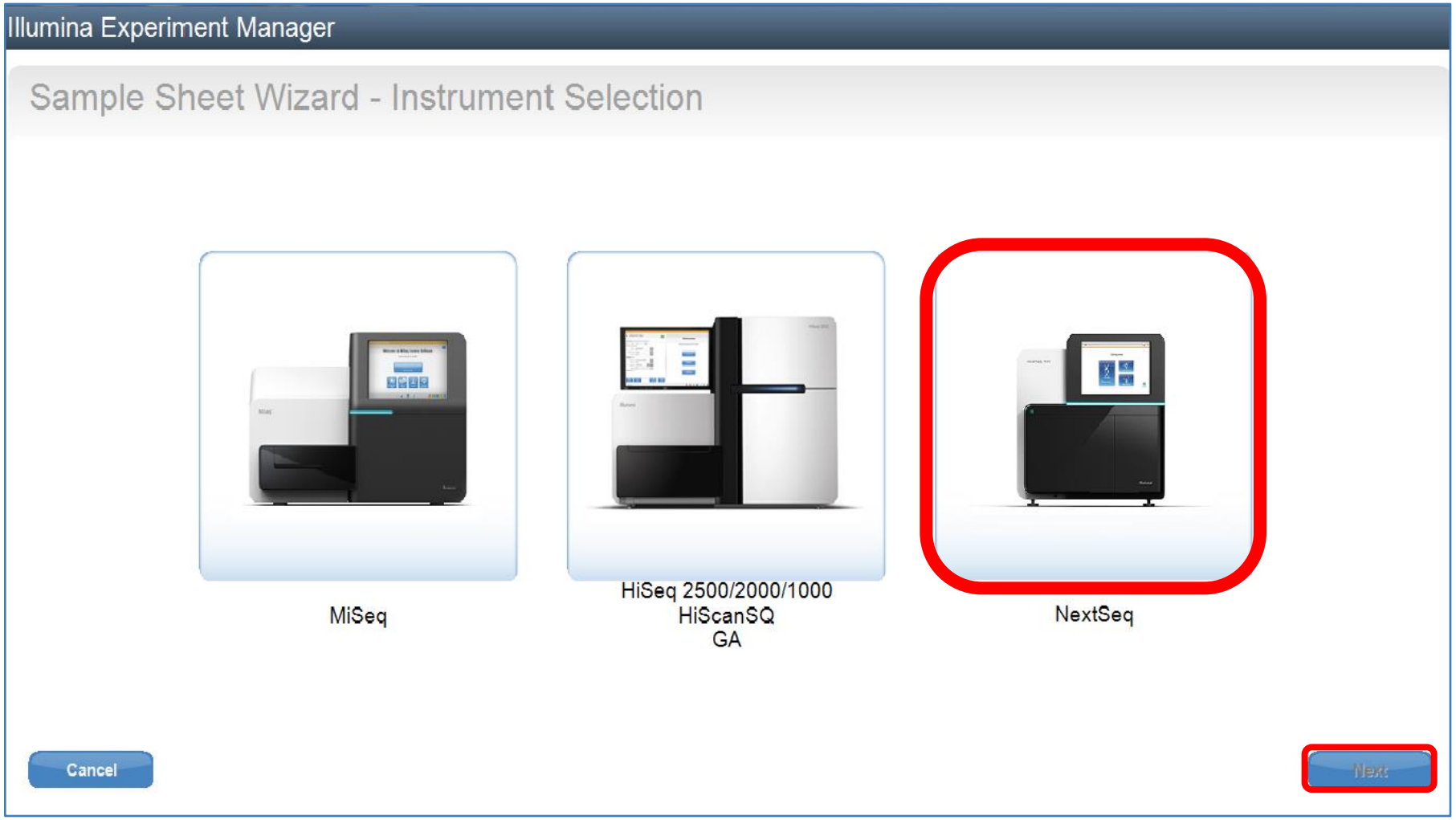
HiSeq　CASAVAでつくるFASTQ

サポートウェビナーシリーズ2013

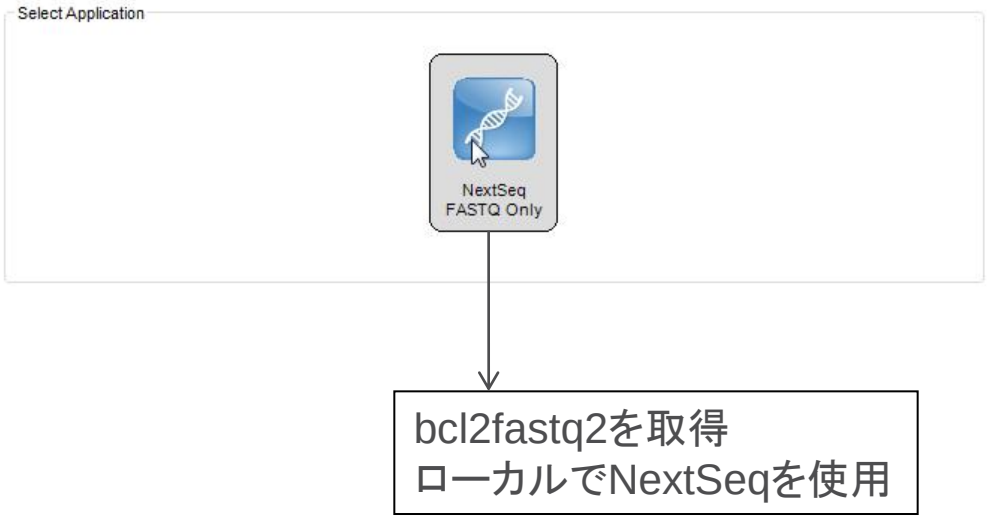
2013/10/11
「CASAVAでつくるFASTQ -- HiSeq/MiSeqのデータをLinuxでdemultiplex (single/dual)」

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

サンプルシートの作成　– Instrument Selection



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」

イルミナサポートウェビナー(http://www.illuminakk.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。

illumina®

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

illumina®