

# SAV (Sequencing Analysis Viewer) での Runの評価とその改善のための提案

Sep 18, 2015



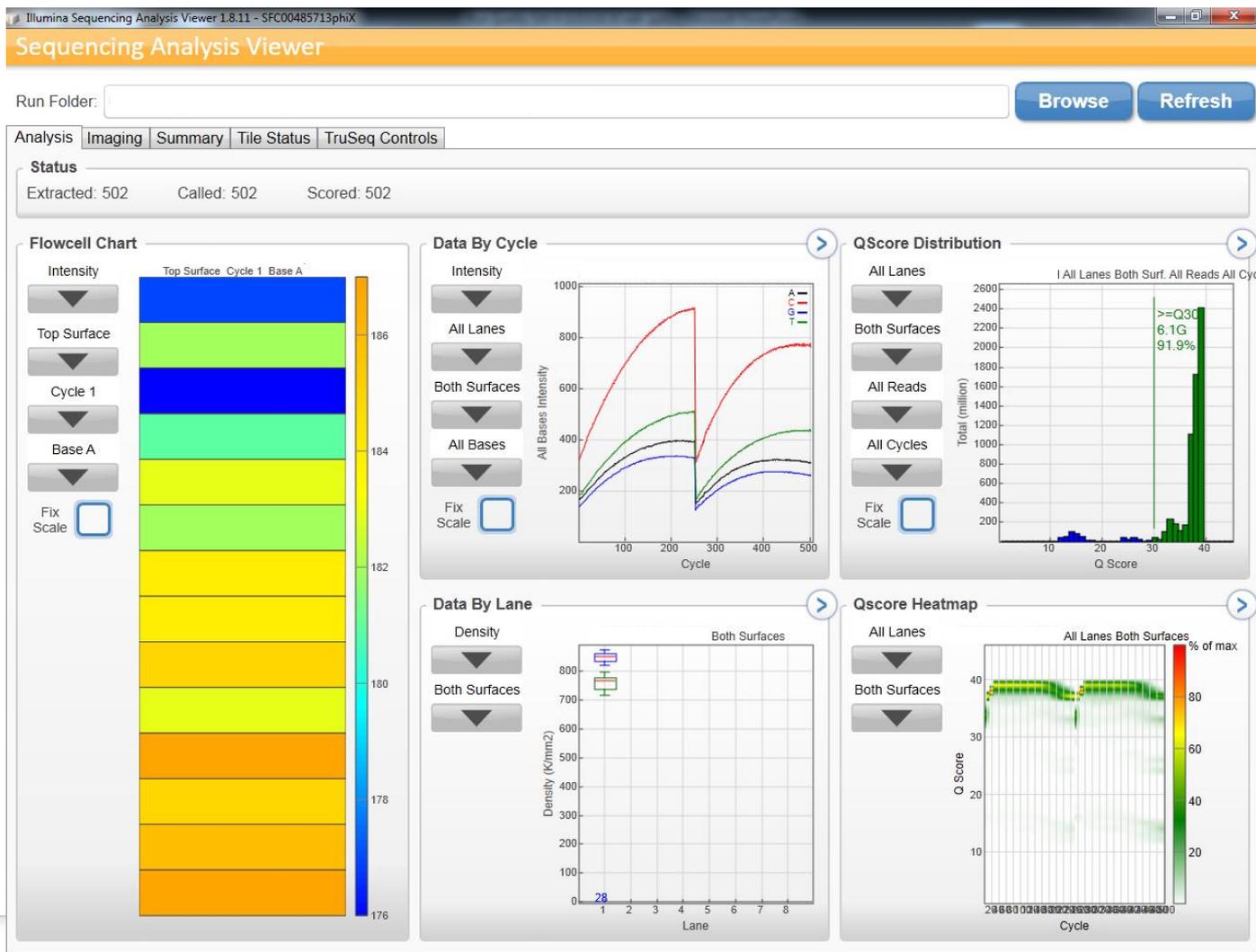
山重 リエ  
イルミナ株式会社  
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 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®

# SAV (Sequencing Analysis Viewer) とは？

ランの状況をモニターしたりランのクオリティを評価するためのソフトウェア」です。配列情報などを参照するためのものではありません。



# SAVのインストールとセットアップ

## SAVをインストールするためのPCの条件

### Requirements

Sequencing Analysis Viewer Software does not need an advanced personal computer, because the instrument control computer running the Real-Time Analysis (RTA) software does the heavy computational work. The following items are required to run the software:

- ▶ Desktop computer running 32-bit or 64-bit version Windows XP, Windows Vista, or Windows 7
- ▶ Network access to the run data
- ▶ .Net framework 4.0

イルミナ株式会社のホームページよりダウンロード可能です

[http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/sequencing\\_analysis\\_viewer\\_sav.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.html)

イルミナの各種シーケンサーにはすでにインストールされた状態になっております。

**\* 最新バージョンのSAV v1.9.1は.Net Framework 4.5がPCにインストールされている必要があるので、ご注意ください。**

# SAVでランのデータを参照する際に必要なデータ

- ▶ Run folderの直下にある以下の3つデータ
  - InterOp folder
  - runParameters.xml
  - RunInfo.xml
  
- ▶ イルミナよりトラブルシューティングの際にこれらのデータの送付をお願いすることがございます

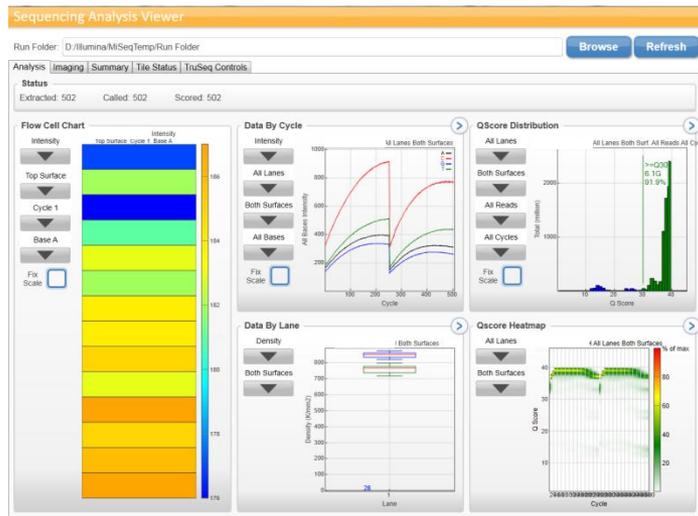
| 名前                                  | 更新日時             |
|-------------------------------------|------------------|
| Config                              | 2014/07/02 12:40 |
| Data                                | 2014/07/02 12:56 |
| InterOp                             | 2014/07/02 12:56 |
| Logs                                | 2014/07/02 12:58 |
| Queued                              | 2014/05/02 19:58 |
| Recipe                              | 2014/07/02 12:58 |
| Thumbnail_Images                    | 2014/07/02 12:58 |
| AmpliconRunStatistics.xml           | 2014/05/02 19:58 |
| AnalysisError.txt                   | 2014/05/02 19:33 |
| AnalysisLog.txt                     | 2014/05/02 19:58 |
| Basecalling_Netcopy_complete.txt    | 2014/05/02 19:11 |
| Basecalling_Netcopy_complete_Rea... | 2014/05/02 6:17  |
| Basecalling_Netcopy_complete_Rea... | 2014/05/02 7:04  |
| Basecalling_Netcopy_complete_Rea... | 2014/05/02 8:24  |
| Basecalling_Netcopy_complete_Rea... | 2014/05/02 19:11 |
| CompletedJobInfo.xml                | 2014/05/02 19:58 |
| ImageAnalysis_Netcopy_complete.txt  | 2014/05/02 19:06 |
| ImageAnalysis_Netcopy_complete_...  | 2014/05/02 6:17  |
| ImageAnalysis_Netcopy_complete_...  | 2014/05/02 7:02  |
| ImageAnalysis_Netcopy_complete_...  | 2014/05/02 8:21  |
| ImageAnalysis_Netcopy_complete_...  | 2014/05/02 19:06 |
| QueuedForAnalysis.txt               | 2014/05/02 19:11 |
| RTAComplete.txt                     | 2014/05/02 19:11 |
| RunCheckDetail.txt                  | 2014/05/02 19:32 |
| RunCompletionStatus.xml             | 2014/05/02 19:32 |
| RunInfo.xml                         | 2014/05/01 18:49 |
| RunParameters.xml                   | 2014/05/01 18:49 |
| SampleSheet.csv                     | 2014/05/01 17:54 |

# RunのデータをSAVで参照するための操作

## Run folderのpathを指定して、Refresh

The screenshot displays the Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV) 1.8.37 interface. At the top, the title bar reads "Illumina Sequencing Analysis Viewer 1.8.37". Below it, the main window title is "Sequencing Analysis Viewer". A red box labeled "1" highlights the "Run Folder" input field, which contains the path "D://illumina/MiSeqTemp/Run Folder". To the right of this field are "Browse" and "Refresh" buttons, with the "Refresh" button highlighted by a red box labeled "2". Below the input field, there are tabs for "Analysis", "Imaging", "Summary", "Tile Status", and "TruSeq Controls". The "Status" section shows "Extracted: 0", "Called: 0", and "Scored: 0". The main area is divided into several panels: "Flow Cell Chart" (Intensity, Top Surface, Cycle 1, Base A, Fix Scale), "Data By Cycle" (Intensity, All Lanes, Both Surfaces, All Bases, Fix Scale), "QScore Distribution" (All Lanes, Both Surfaces, All Reads, All Cycles, Fix Scale), "Data By Lane" (Density, Both Surfaces), and "QScore Heatmap" (All Lanes, Both Surfaces).

# 装置によって、SAVのデータの見た目が異なります



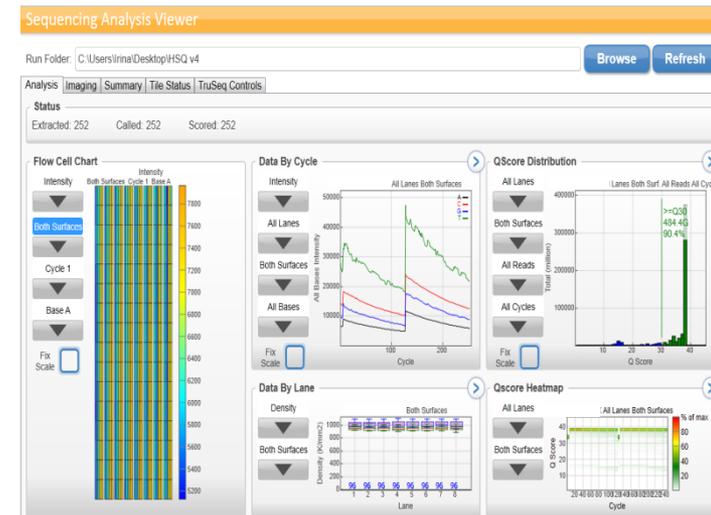
MiSeq



NextSeq



HiSeq  
Rapid  
Run



HiSeq  
High  
Output

## ランの評価で特に重要となる項目

- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスタ密度
- ▶ Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

## ランの評価で特に重要となる項目

- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスタ密度
- ▶ Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

# クオリティスコア（Q30）とは？

- ▶ Q Score = Phredクオリティスコアベースコールにおけるエラー率の予測指標
- ▶ %Q30とは、クオリティスコアがQ30以上だった塩基の割合

| Phred Quality Score | 塩基が誤ってコールされる確率 | ベースコールの正確性 | Q-score |
|---------------------|----------------|------------|---------|
| 10                  | 1 in 10        | 90%        | Q10     |
| 20                  | 1 in 100       | 99%        | Q20     |
| 30                  | 1 in 1000      | 99.9%      | Q30     |
| 40                  | 1 in 10000     | 99.99%     | Q40     |

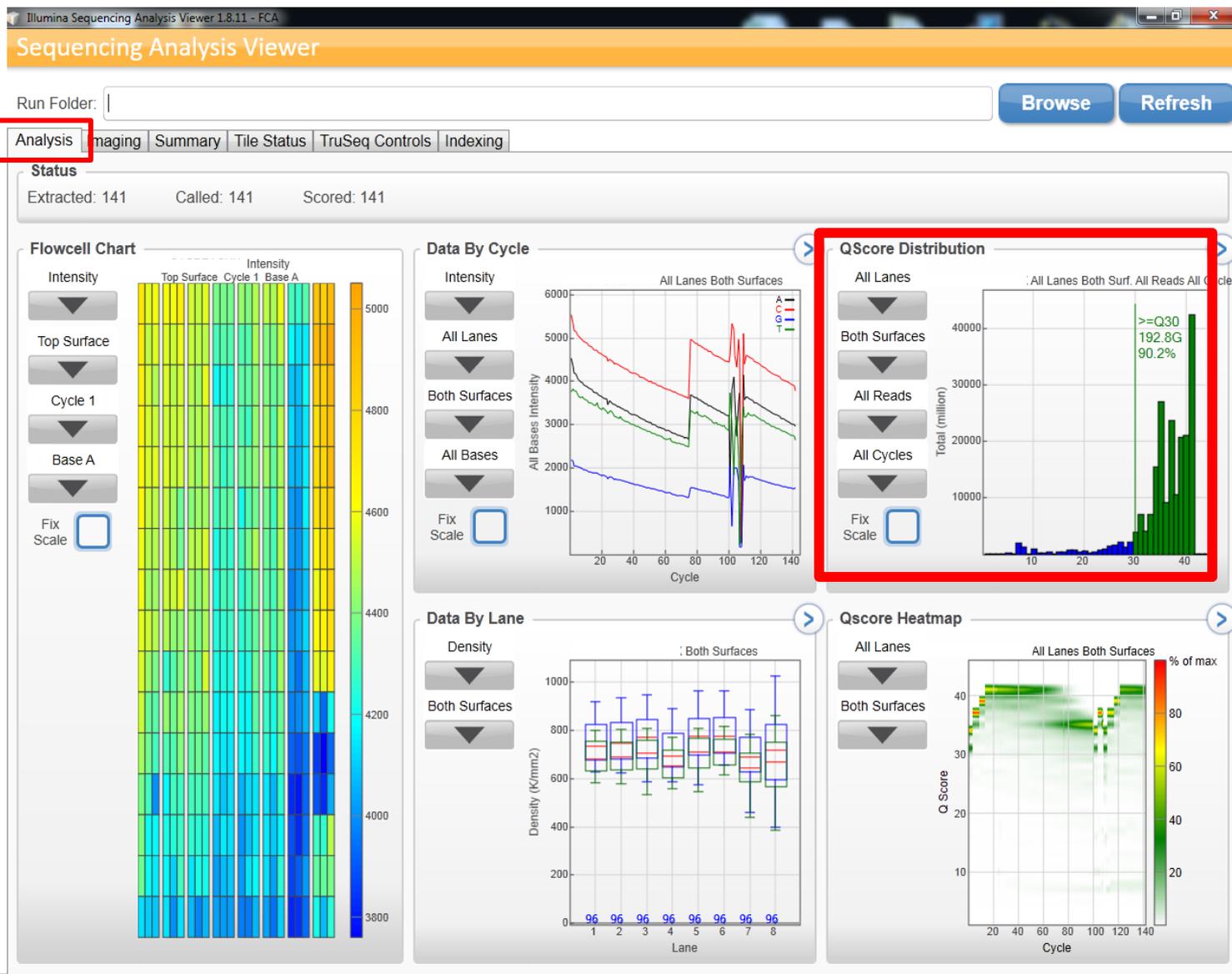
## Understanding Quality Score:

[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote\\_understanding\\_quality\\_scores.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf)

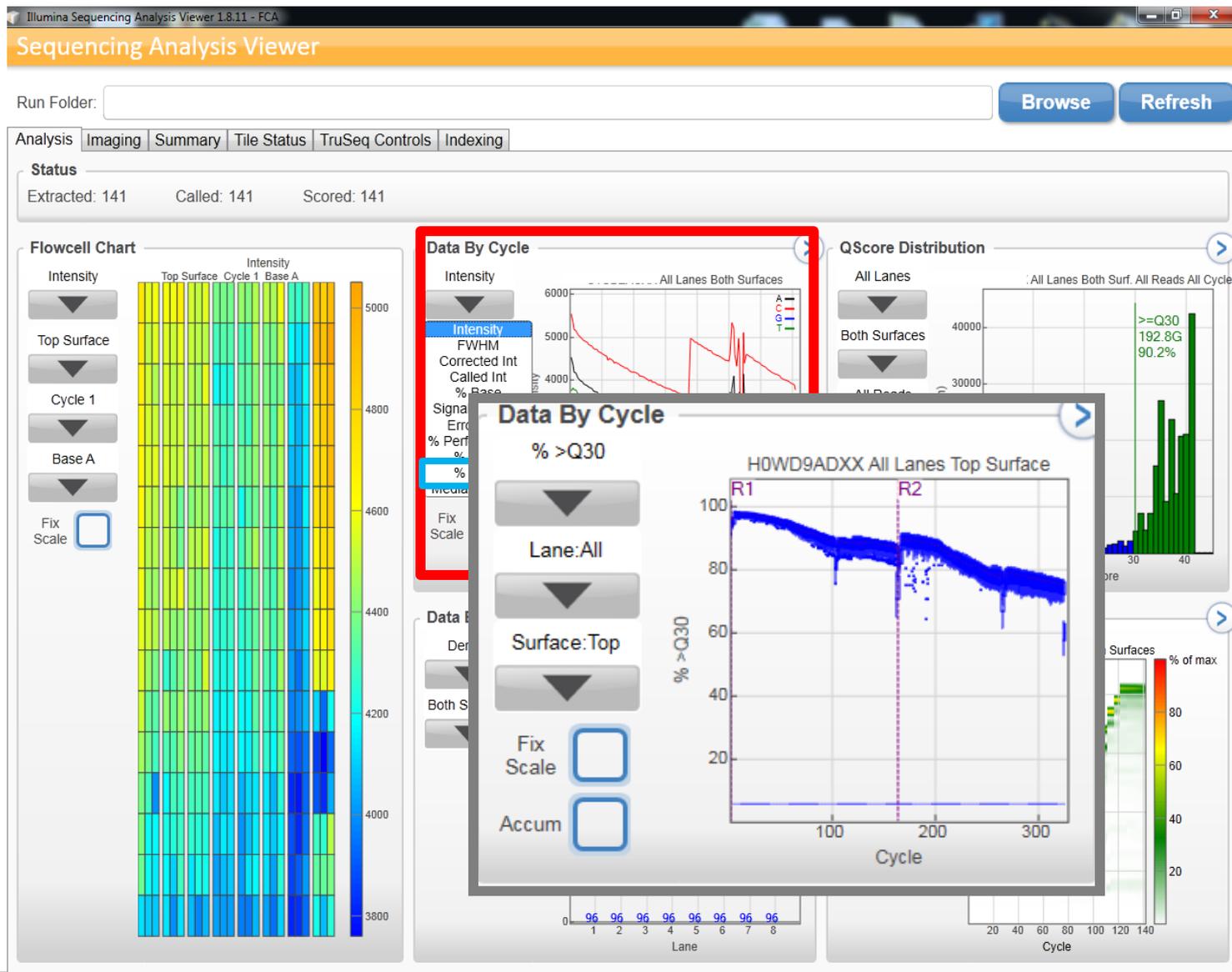
## Quality Scores for Next-Generation Sequencing

[http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf)

# Analysisタブ : QScore Distribution



# Analysisタブ : Data By Cycle



# Summaryタブ

Run Folder: |

Analysis | Imaging | **Summary**

## Run Summary

| Level             | Yield Total (G) | Projected Total Yield (G) | Aligned (%) | Error Rate (%) | Intensity Cycle 1 | % >= Q30 |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------|----------------|-------------------|----------|
| Read 1            | 265.85          | 265.85                    | 0.68        | 0.33           | 6548              | 91.98    |
| Read 2            | 265.85          | 265.85                    | 0.67        | 0.51           | 11529             | 89.22    |
| Non-Indexed Total | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60    |
| Total             | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60    |

## Read 1

| Lane | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29     | 93.50 +/- 0.95 | 0.116 / 0.155    | 285.18    | 266.58       | 92.14    | 33.32     | 125              | 0.69 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29     | 93.17 +/- 0.98 | 0.113 / 0.155    | 285.13    | 265.61       | 92.03    | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30     | 93.02 +/- 1.02 | 0.113 / 0.157    | 285.13    | 265.17       | 92.00    | 33.15     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32     | 92.93 +/- 1.02 | 0.112 / 0.145    | 285.08    | 264.85       | 92.09    | 33.11     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31     | 93.25 +/- 0.95 | 0.112 / 0.149    | 284.87    | 265.57       | 91.93    | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32     | 93.21 +/- 0.89 | 0.112 / 0.156    | 285.39    | 265.96       | 91.76    | 33.25     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31     | 93.31 +/- 0.87 | 0.113 / 0.153    | 285.84    | 266.67       | 91.84    | 33.33     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33     | 93.40 +/- 0.94 | 0.118 / 0.155    | 285.23    | 266.35       | 92.08    | 33.29     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |

## Read 2

| Lane | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29     | 93.50 +/- 0.95 | 0.158 / 0.174    | 285.18    | 266.58       | 89.47    | 33.32     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29     | 93.17 +/- 0.98 | 0.159 / 0.175    | 285.13    | 265.61       | 89.30    | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30     | 93.02 +/- 1.02 | 0.158 / 0.179    | 285.13    | 265.17       | 89.16    | 33.15     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32     | 92.93 +/- 1.02 | 0.161 / 0.161    | 285.08    | 264.85       | 89.27    | 33.11     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31     | 93.25 +/- 0.95 | 0.153 / 0.167    | 284.87    | 265.57       | 89.23    | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32     | 93.21 +/- 0.89 | 0.158 / 0.175    | 285.39    | 265.96       | 89.08    | 33.25     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31     | 93.31 +/- 0.87 | 0.158 / 0.175    | 285.84    | 266.67       | 89.08    | 33.33     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33     | 93.40 +/- 0.94 | 0.163 / 0.180    | 285.23    | 266.35       | 89.20    | 33.29     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |

## それぞれの装置における% $\geq$ Q30の仕様 (PhiXを使用したデータです)

|                       | 2x50bp      | 2x75bp      | 2x100bp     | 2x125bp     | 2x150bp     | 2x250bp     | 2x300bp     |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GAllx                 | $\geq 85\%$ | N/A         | $\geq 80\%$ | N/A         | N/A         | N/A         | N/A         |
| HiSeq<br>HO SBS<br>V3 | $\geq 85\%$ | N/A         | $\geq 80\%$ | N/A         | N/A         | N/A         | N/A         |
| HiSeq<br>HO SBS<br>V4 | $\geq 85\%$ | N/A         | $\geq 80\%$ | $\geq 80\%$ | N/A         | N/A         | N/A         |
| HiSeq<br>Rapid Run    | $\geq 85\%$ | N/A         | $\geq 80\%$ | N/A         | N/A         | $\geq 75\%$ | N/A         |
| NextSeq               | N/A         | $\geq 80\%$ | N/A         | N/A         | $\geq 75\%$ | N/A         | N/A         |
| MiSeq V2              | N/A         | N/A         | N/A         | N/A         | $\geq 80\%$ | $\geq 75\%$ | N/A         |
| MiSeq V3              | N/A         | $\geq 85\%$ | N/A         | N/A         | N/A         | N/A         | $\geq 70\%$ |

# クオリティスコアの低下を防ぐには？

## ▶ クラスタ密度を適正に保つ

- 最適クラスタ密度は装置、用いるライブラリーによって異なる。
- 塩基バランスに偏りのあるライブラリーを用いる場合には、低めのクラスタ密度に設定していただくことを推奨。

### (PhiXの場合)

| <u>Platform</u>                                      | <u>Optimal Loading Concentration</u> | <u>Optimal Raw Cluster Density for PhiX runs</u> |
|--|--------------------------------------|--|
| GAllx (v5 cluster kit with SCS 2.8 or later)         | 12.0 pM                              | 700-800K clusters/mm <sup>2</sup>                |
| HiSeq 2000/2500 High Output v3                       | 12.0 pM                              | 750-850K clusters/mm <sup>2</sup>                |
| HiSeq 2500 High Output v4                            | 18.0 pM                              | 950-1050K clusters/mm <sup>2</sup>               |
| HiSeq 2500 Rapid Run v1 and v2                       | 12.0 pM                              | 850-1000K clusters/mm <sup>2</sup>               |
| MiSeq v2   | 12.5 pM                              | 1000-1200K clusters/mm <sup>2</sup>              |
| MiSeq v3   | 15-20 pM                             | 1200-1400K clusters/mm <sup>2</sup>              |
| NextSeq 500 NextSeq Control Software v1.2 or earlier | 3.0 pM                               | 170-220K clusters/mm <sup>2</sup>                |
| NextSeq 500 NextSeq Control Software v1.3 or later   | 1.8 pM                               | 170-220K clusters/mm <sup>2</sup>                |

[https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/u2a5\\_szu\\_U6m0GkgddS6Vg/phix-loading-concentrations-for-verification-runs](https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/u2a5_szu_U6m0GkgddS6Vg/phix-loading-concentrations-for-verification-runs)

# クオリティスコアの低下を防ぐには？

## ▶ 塩基バランスの偏ったライブラリーを用いられる場合は、適切なラン条件を用いること

- 16S metagenome amplicon サンプルなど
- クラスター密度を低めに設定していただく
- PhiXを添加して、ライブラリーの塩基バランスを整えていただく
- Low Diversity サンプルを解析するためのテクニック（2013/12/6 サポートウェビナー）

[http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2013\\_illumina\\_techsupport\\_session28.pdf](http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2013_illumina_techsupport_session28.pdf)

- 16S rRNA メタゲノム解析のポイント プロトコールのご紹介（2014/5/9 サポートウェビナー）

[http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2014\\_techsupport\\_session3.pdf](http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2014_techsupport_session3.pdf)

## ランの評価で特に重要となる項目

- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスター密度
- ▶ Cluster Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

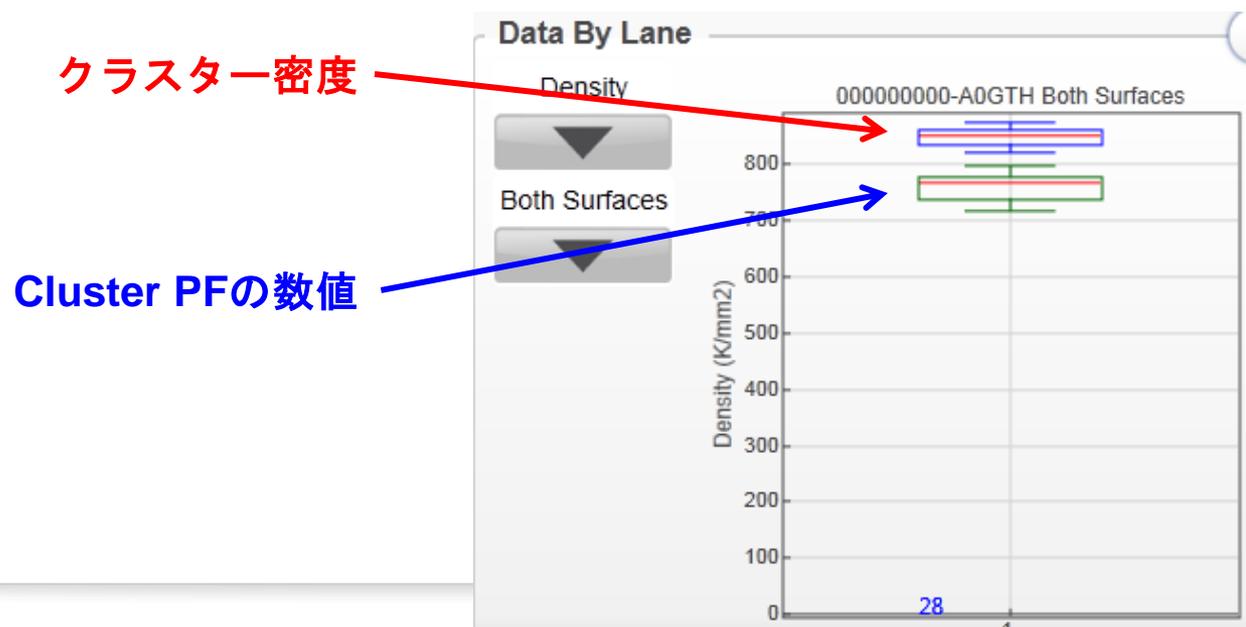
# 適正なクラスター密度を狙って、実験を行うことが重要

- ▶ 適正なクラスター密度でないと、Q Scoreが低くなったり
  - 推奨クラスター密度（PhiXの場合）

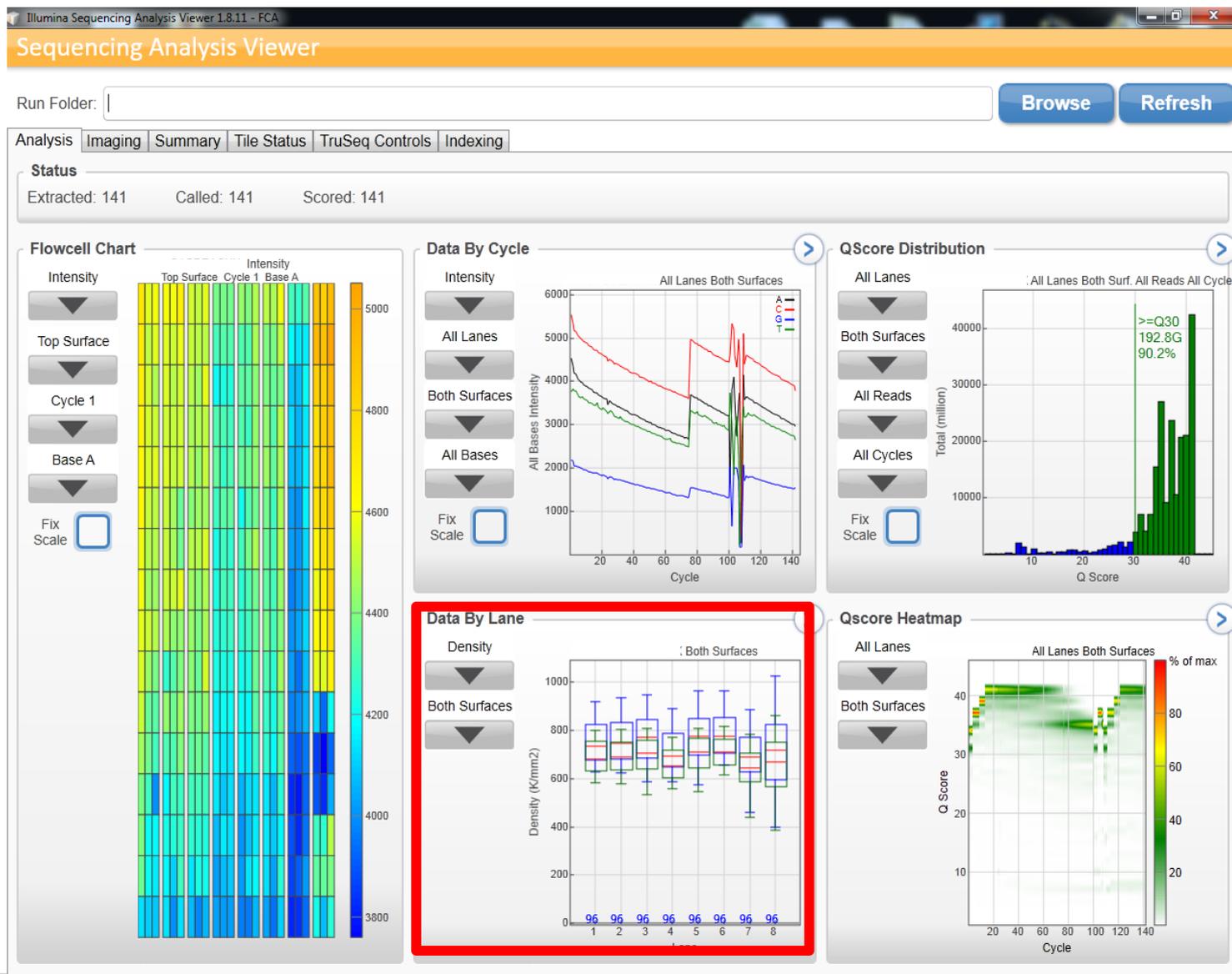
[https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/u2a5\\_szu\\_U6m0GkgddS6Vg/phi-x-loading-concentrations-for-verification-runs](https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/u2a5_szu_U6m0GkgddS6Vg/phi-x-loading-concentrations-for-verification-runs)

- ▶ %Cluster Passing Filter (% Cluster PF) が得られない可能性がある
  - Cluster Pass Filterを最適化するには（2013/11/15サポートウェビナー）

[http://www.illumina.com/documents/pdf/2013\\_techsupport\\_session27.pdf](http://www.illumina.com/documents/pdf/2013_techsupport_session27.pdf)



# Analysisタブ : Data by Lane



# Summaryタブ

Run Folder:

Analysis Imaging Summary

## Run Summary

| Level             | Yield Total (G) | Projected Total Yield (G) | Aligned (%) | Error Rate (%) | Intensity Cycle 1 | % $\geq$ Q30 |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------|----------------|-------------------|--------------|
| Read 1            | 265.85          | 265.85                    | 0.68        | 0.33           | 6548              | 91.98        |
| Read 2            | 265.85          | 265.85                    | 0.67        | 0.51           | 11529             | 89.22        |
| Non-Indexed Total | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60        |
| Total             | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60        |

## Read 1

| Lane | Tiles | Density (K/mm <sup>2</sup> ) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % $\geq$ Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|------------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29                  | 93.50 +/- 0.95 | 0.116 / 0.155    | 285.18    | 266.58       | 92.14        | 33.32     | 125              | 0.69 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29                  | 93.17 +/- 0.98 | 0.113 / 0.155    | 285.13    | 265.61       | 92.03        | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30                  | 93.02 +/- 1.02 | 0.113 / 0.157    | 285.13    | 265.17       | 92.00        | 33.15     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32                  | 92.93 +/- 1.02 | 0.112 / 0.145    | 285.08    | 264.85       | 92.09        | 33.11     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31                  | 93.25 +/- 0.95 | 0.112 / 0.149    | 284.87    | 265.57       | 91.93        | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32                  | 93.21 +/- 0.89 | 0.112 / 0.156    | 285.39    | 265.96       | 91.76        | 33.25     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31                  | 93.31 +/- 0.87 | 0.113 / 0.153    | 285.84    | 266.67       | 91.84        | 33.33     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33                  | 93.40 +/- 0.94 | 0.118 / 0.155    | 285.23    | 266.35       | 92.08        | 33.29     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |

## Read 2

| Lane | Tiles | Density (K/mm <sup>2</sup> ) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % $\geq$ Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|------------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29                  | 93.50 +/- 0.95 | 0.158 / 0.174    | 285.18    | 266.58       | 89.47        | 33.32     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29                  | 93.17 +/- 0.98 | 0.159 / 0.175    | 285.13    | 265.61       | 89.30        | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30                  | 93.02 +/- 1.02 | 0.158 / 0.179    | 285.13    | 265.17       | 89.16        | 33.15     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32                  | 92.93 +/- 1.02 | 0.161 / 0.161    | 285.08    | 264.85       | 89.27        | 33.11     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31                  | 93.25 +/- 0.95 | 0.153 / 0.167    | 284.87    | 265.57       | 89.23        | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32                  | 93.21 +/- 0.89 | 0.158 / 0.175    | 285.39    | 265.96       | 89.08        | 33.25     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31                  | 93.31 +/- 0.87 | 0.158 / 0.175    | 285.84    | 266.67       | 89.08        | 33.33     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33                  | 93.40 +/- 0.94 | 0.163 / 0.180    | 285.23    | 266.35       | 89.20        | 33.29     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |

# imagesタブ

塩基ごとに画像を切り替えられる

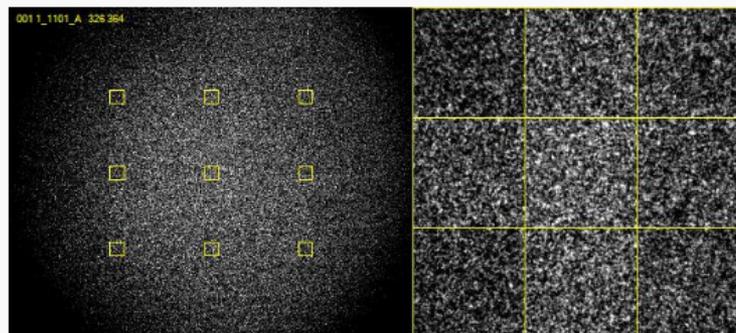
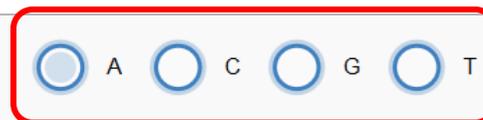
Analysis | Imaging | Summary

Cycle All Surface All Read All Tile Number All

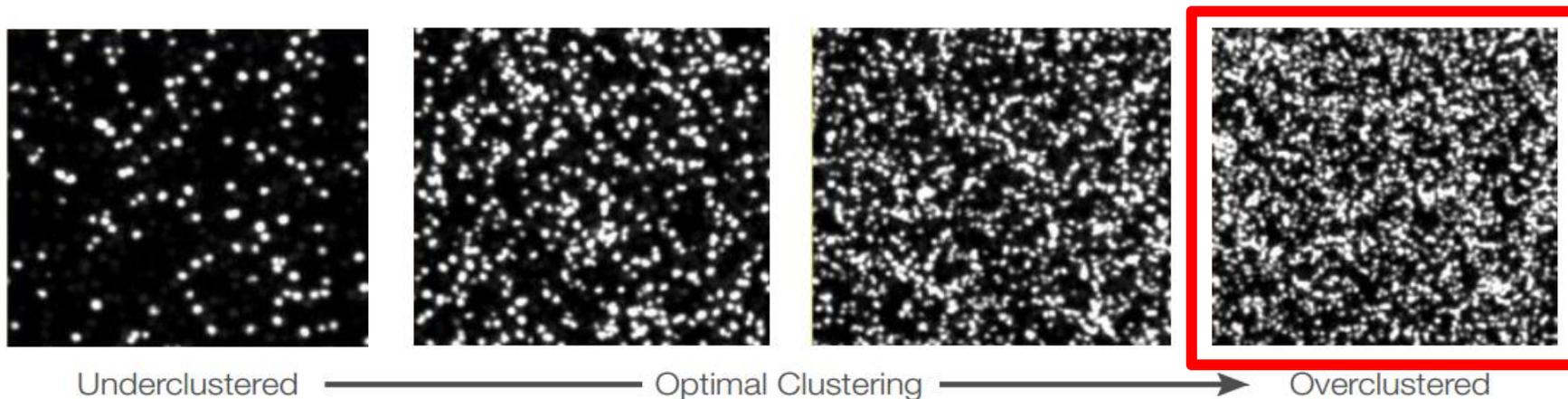


| Lane | Tile | Cycle | Density (k/mm2) | Density Pf (k/mm2) | Cluster Count (k) | Cluster Count Pf (k) | % Pass Filter |
|------|------|-------|-----------------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------|
| 1    | 1101 | 1     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 2     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 3     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 4     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 5     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 6     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 7     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 8     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 9     | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 10    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 11    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 12    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 13    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 14    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 15    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 16    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 17    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 18    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |
| 1    | 1101 | 19    | 1093.4          | 0                  | 737.4             | 0                    | 0             |

Rows=23484 Disp=23484 Sel=1 Filter



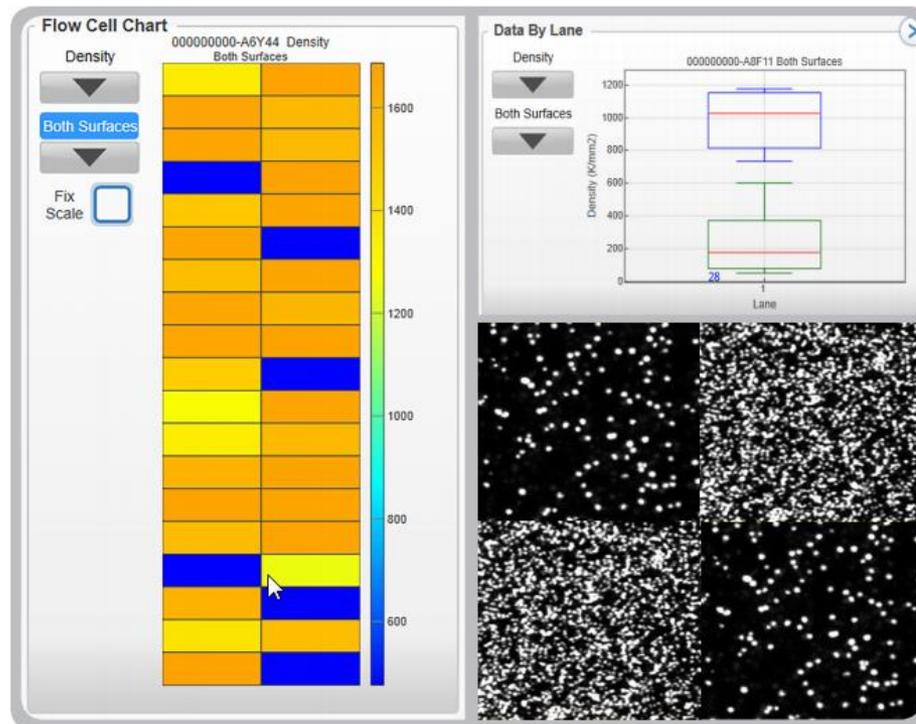
## クラスター密度が高すぎる画像の例



- ▶ クラスター同士が密接している、または重なり合っている
- ▶ S/N比が低くなるために、フォーカスが取りにくくなり、フォーカスエラーの原因になることもあります
  - MiSeqでフォーカスエラーが出た！ どうしたら良い？（2014/7/25 サポートウェビナー）

[http://www.illumina.com/documents/pdf/2014\\_techsupport\\_session8.pdf](http://www.illumina.com/documents/pdf/2014_techsupport_session8.pdf)

# MiSeqのオーバークラスタの診断と対策についての Tech noteのご紹介



Diagnosing and Preventing Flow Cell  
Overclustering on the MiSeq® System  
Identifying and resolving issues with high cluster density.

<https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/miseq-overclustering-primer-770-2014-038.pdf>

## ランの評価で特に重要となる項目

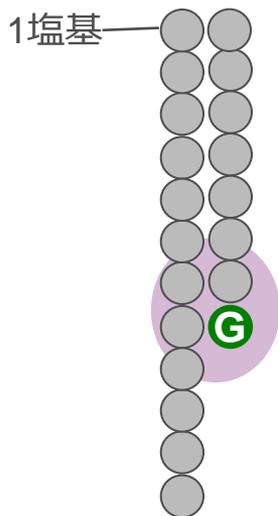
- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスタ密度
- ▶ Cluster Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

# Phasing/Prephasingについて

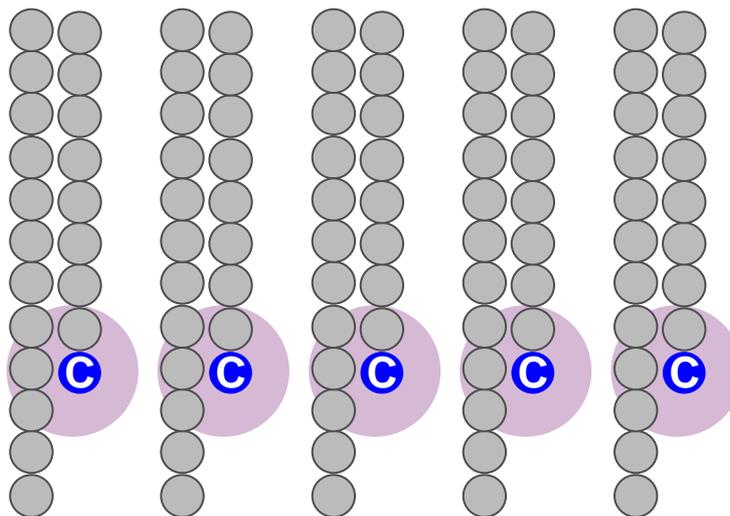
- ▶ Sequencing は化学反応で進むので、一部の塩基が①遅れたり、逆に②進みすぎたりする  
→ 前後の塩基の情報から補正を行う

①反応が遅れたDNA

**Phasing**

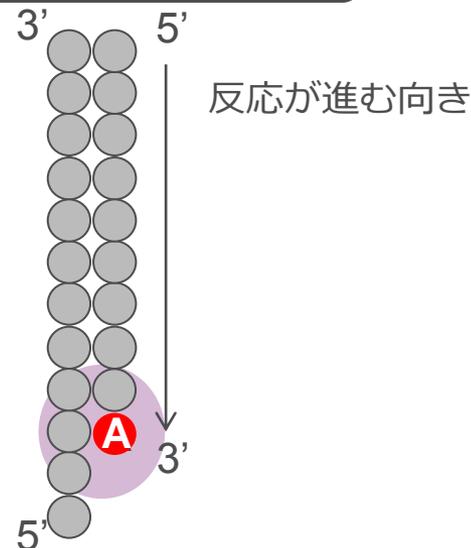


理想的に反応しているDNA



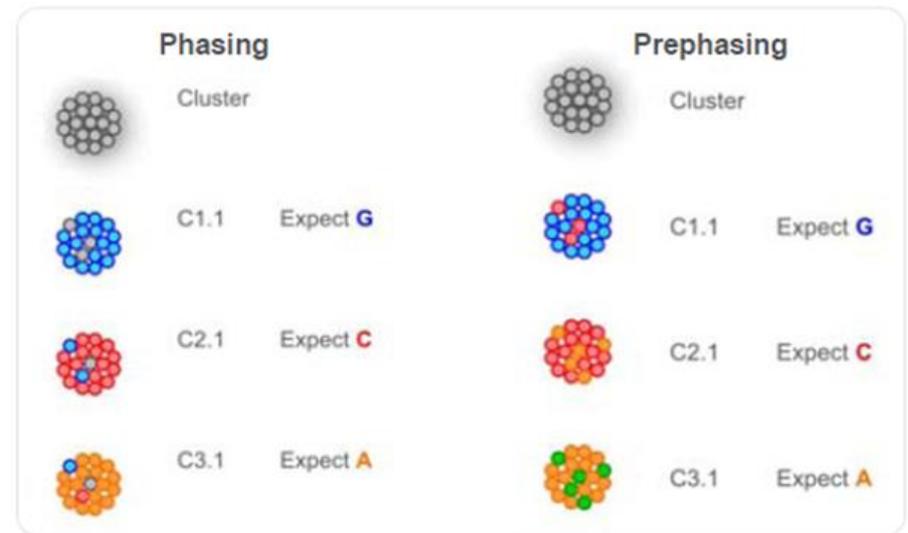
②反応が進みすぎたDNA

**Prephasing**



# Phasing/Prephasingについて

- ▶ Phasing/Prephasingの値がそれぞれ、~0.5%であれば正常
- ▶ PhasingとPrephasingは酵素反応や試薬Deliveryの失敗を補正する
  - 試薬のラインのコンタミ (Washが不十分)
  - 室内温度
  - 装置のFC・Reagent Chillerの温度
  - 問題のある試薬
- ▶ 塩基バランスの悪いライブラリーの場合、正しく算出されない場合がある



# Summaryタブ

Run Folder:

Analysis | Imaging | Summary

## Run Summary

| Level             | Yield Total (G) | Projected Total Yield (G) | Aligned (%) | Error Rate (%) | Intensity Cycle 1 | % >= Q30 |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------|----------------|-------------------|----------|
| Read 1            | 265.85          | 265.85                    | 0.68        | 0.33           | 6548              | 91.98    |
| Read 2            | 265.85          | 265.85                    | 0.67        | 0.51           | 11529             | 89.22    |
| Non-Indexed Total | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60    |
| Total             | 531.69          | 531.69                    | 0.68        | 0.42           | 9039              | 90.60    |

## Read 1

| Lane | Tiles | Density (K/mm <sup>2</sup> ) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|------------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29                  | 93.50 +/- 0.95 | 0.116 / 0.155    | 285.18    | 266.58       | 92.14    | 33.32     | 125              | 0.69 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29                  | 93.17 +/- 0.98 | 0.113 / 0.155    | 285.13    | 265.61       | 92.03    | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30                  | 93.02 +/- 1.02 | 0.113 / 0.157    | 285.13    | 265.17       | 92.00    | 33.15     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32                  | 92.93 +/- 1.02 | 0.112 / 0.145    | 285.08    | 264.85       | 92.09    | 33.11     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31                  | 93.25 +/- 0.95 | 0.112 / 0.149    | 284.87    | 265.57       | 91.93    | 33.20     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32                  | 93.21 +/- 0.89 | 0.112 / 0.156    | 285.39    | 265.96       | 91.76    | 33.25     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31                  | 93.31 +/- 0.87 | 0.113 / 0.153    | 285.84    | 266.67       | 91.84    | 33.33     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33                  | 93.40 +/- 0.94 | 0.118 / 0.155    | 285.23    | 266.35       | 92.08    | 33.29     | 125              | 0.68 +/- 0.0 |

## Read 2

| Lane | Tiles | Density (K/mm <sup>2</sup> ) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Align (%)    |
|------|-------|------------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------|-----------|------------------|--------------|
| 1    | 96    | 1027 +/- 29                  | 93.50 +/- 0.95 | 0.158 / 0.174    | 285.18    | 266.58       | 89.47    | 33.32     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 2    | 96    | 1026 +/- 29                  | 93.17 +/- 0.98 | 0.159 / 0.175    | 285.13    | 265.61       | 89.30    | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 3    | 96    | 1026 +/- 30                  | 93.02 +/- 1.02 | 0.158 / 0.179    | 285.13    | 265.17       | 89.16    | 33.15     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 4    | 96    | 1026 +/- 32                  | 92.93 +/- 1.02 | 0.161 / 0.161    | 285.08    | 264.85       | 89.27    | 33.11     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 5    | 96    | 1025 +/- 31                  | 93.25 +/- 0.95 | 0.153 / 0.167    | 284.87    | 265.57       | 89.23    | 33.20     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 6    | 96    | 1027 +/- 32                  | 93.21 +/- 0.89 | 0.158 / 0.175    | 285.39    | 265.96       | 89.08    | 33.25     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 7    | 96    | 1029 +/- 31                  | 93.31 +/- 0.87 | 0.158 / 0.175    | 285.84    | 266.67       | 89.08    | 33.33     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |
| 8    | 96    | 1027 +/- 33                  | 93.40 +/- 0.94 | 0.163 / 0.180    | 285.23    | 266.35       | 89.20    | 33.29     | 125              | 0.67 +/- 0.0 |

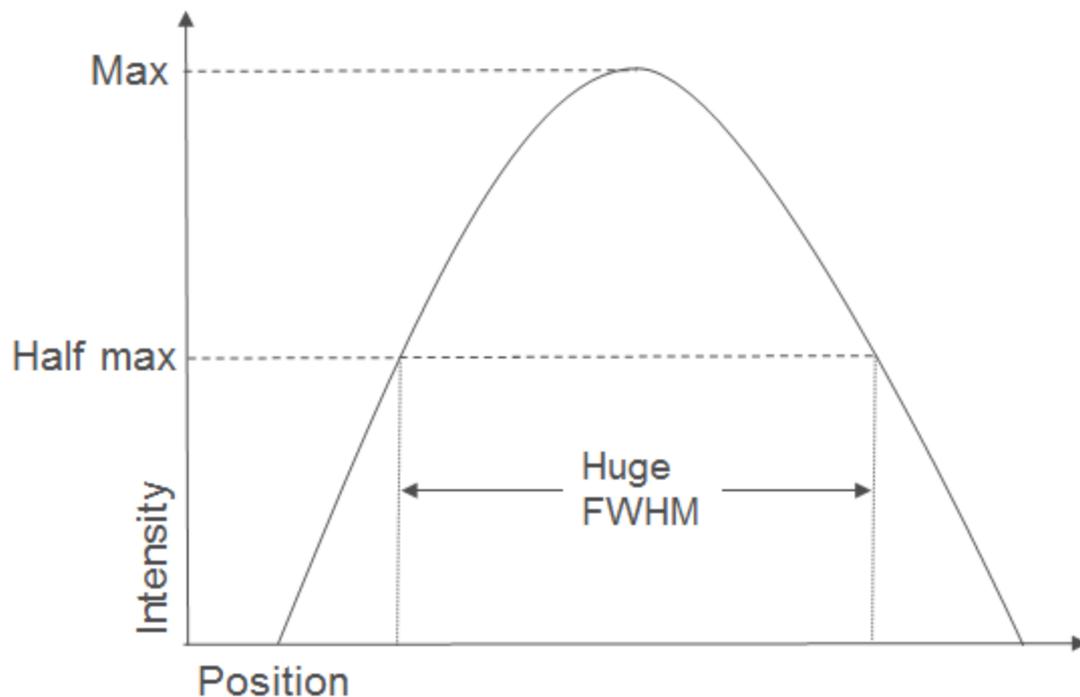
## ランの評価で特に重要となる項目

- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスタ密度
- ▶ Cluster Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

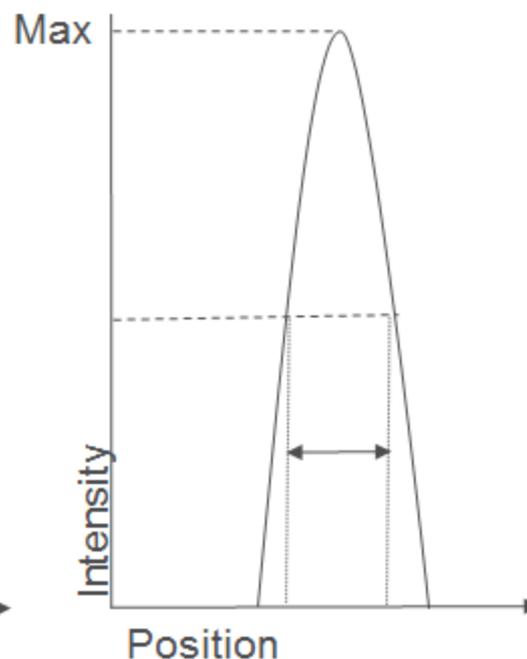
# FWHMとは？

## ▶ FWHM: Full Width Half Max

- フォーカスがうまく撮れているがどうかの指標になる
- Intensityが最大値の半分の時のクラスタの幅

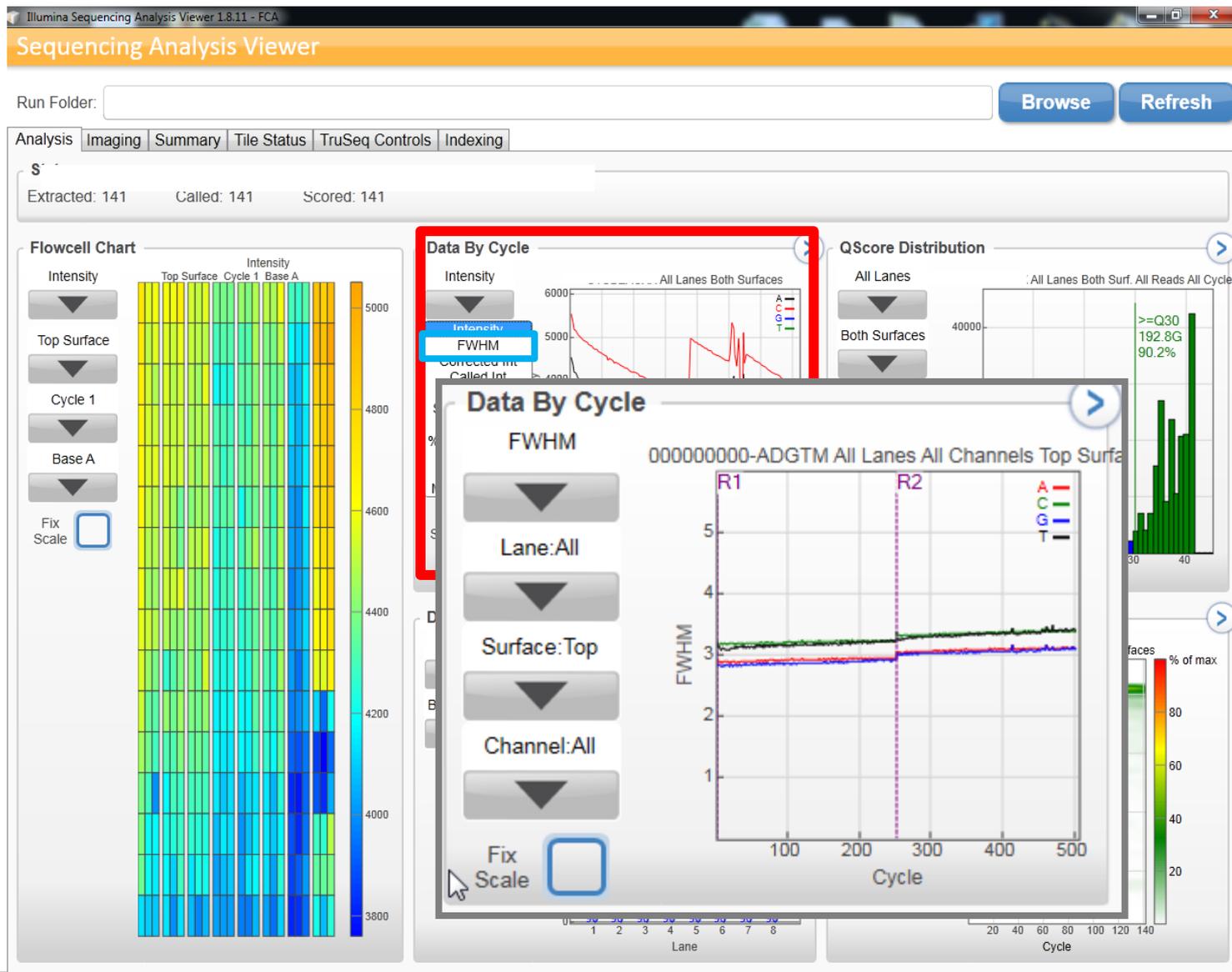


ぼんやりと大きなクラスター



明るくシャープなクラスター

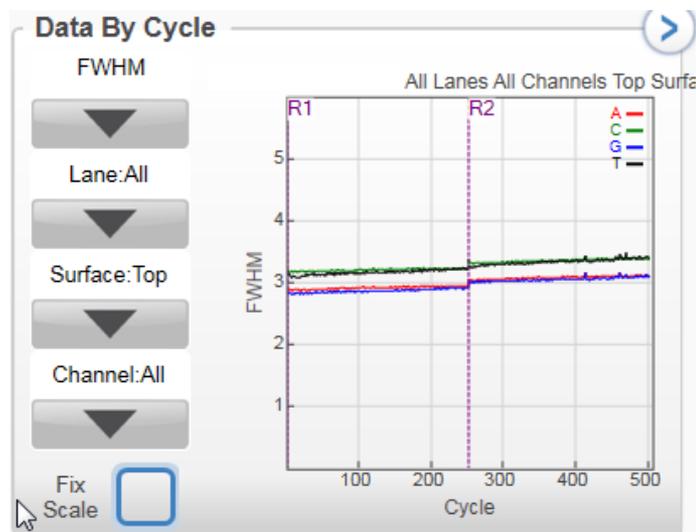
# Analysisタブ : Data By Cycle



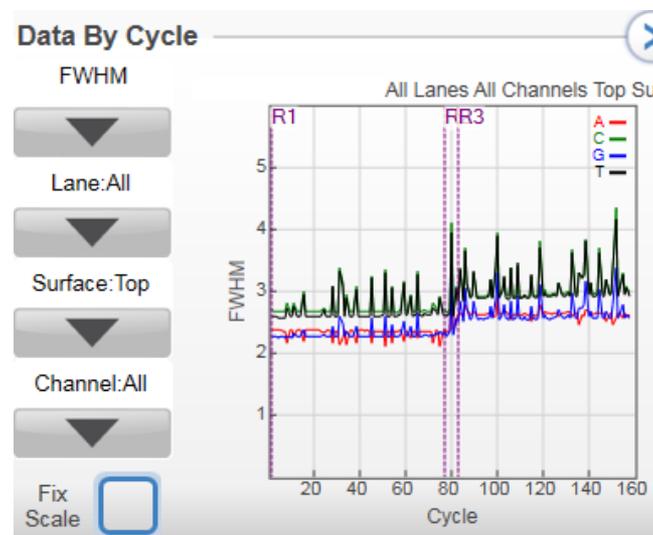
# FWHMとは？

## ▶ FWHM: Full Width Half Max

- 数値は、ライブラリーの長さ依存するが、通常は2~4の間で推移する
- 通常はほぼ水平に推移する。スパイクや、ランの途中から激しく上下する場合はフォーカスが取れていない可能性がある



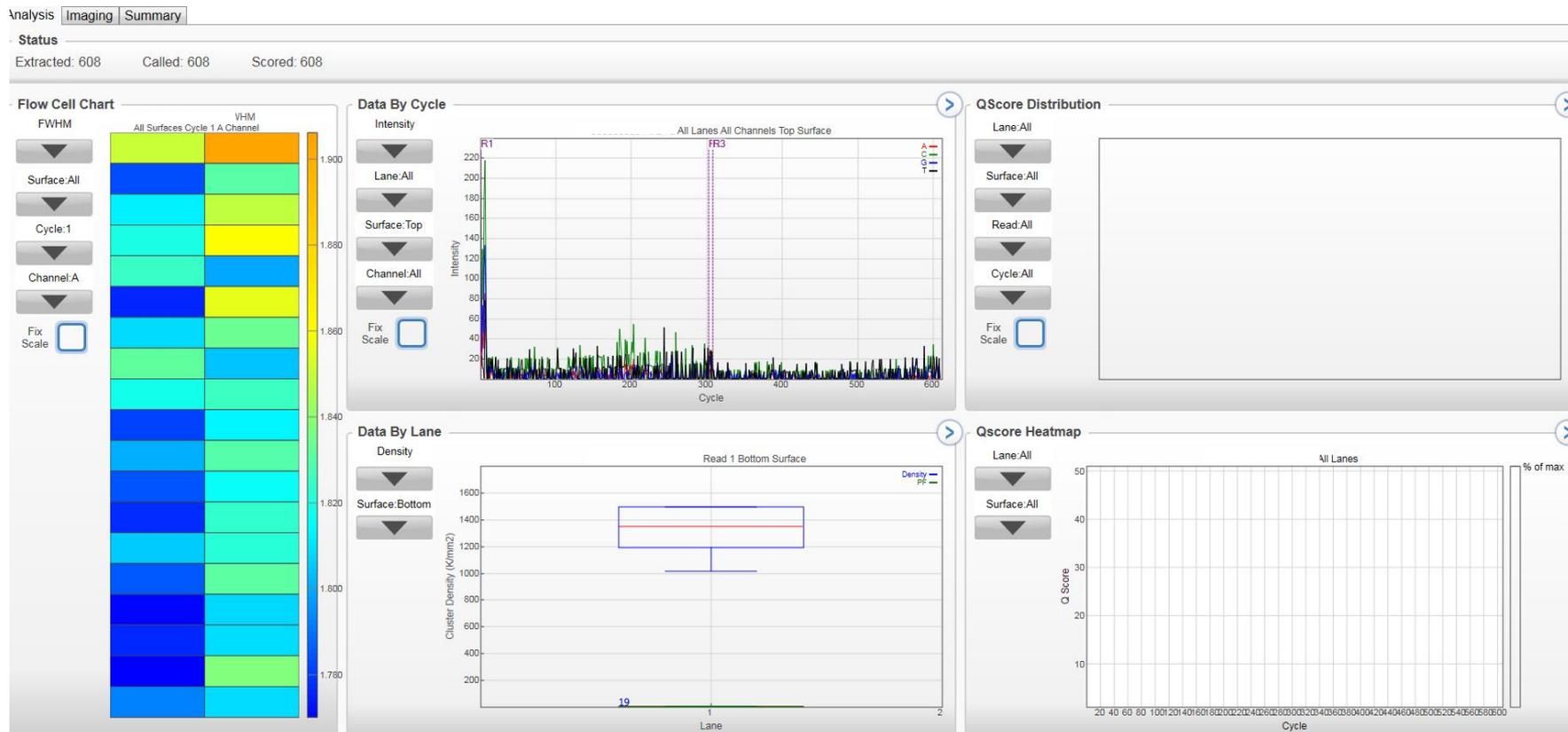
正常なランのFWHM



フォーカスに以上のあるランのFWHM

実際にランのよくあるトラブルのランのデータを見てみましょう！

# Case 1\_\_MiSeq V3試薬 (300PE run)



- ▶ 9サイクル目より激しくIntensityが低下
- ▶ Q scoreが算出されていない

# Case 1\_\_MiSeq V3試薬 (300 PE run)

| Run Summary       |                 |                           |             |                |                   |          |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------|----------------|-------------------|----------|
| Level             | Yield Total (G) | Projected Total Yield (G) | Aligned (%) | Error Rate (%) | Intensity Cycle 1 | % >= Q30 |
| Read 1            | 0.00            | 0.00                      | 0.00        | 0.00           | 77                | 0.00     |
| Read 2 (I)        | 0.00            | 0.00                      | 0.00        | 0.00           | 0                 | 0.00     |
| Read 3            | 0.00            | 0.00                      | 0.00        | 0.00           | 0                 | 0.00     |
| Non-Indexed Total | 0.00            | 0.00                      | 0.00        | 0.00           | 38                | 0.00     |
| Total             | 0.00            | 0.00                      | 0.00        | 0.00           | 26                | 0.00     |

| Read 1 |       |                 |                |                  |           |              |           |           |   |
|--------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|---|
| Lane   | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30  | Yield (G) |   |
| 1      | 38    | 1307 +/- 169    | 0.00 +/- 0.00  | 0.047 / 0.052    | 30.06     | 0.00         | NaN (非数値) | 0.00      | 0 |

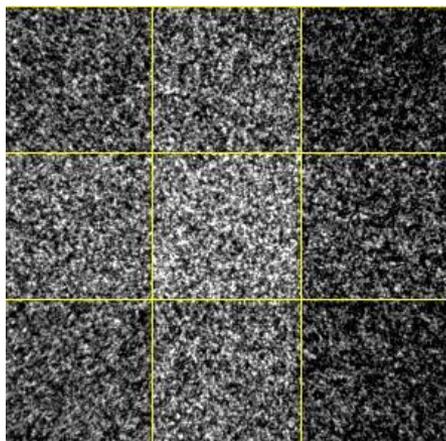
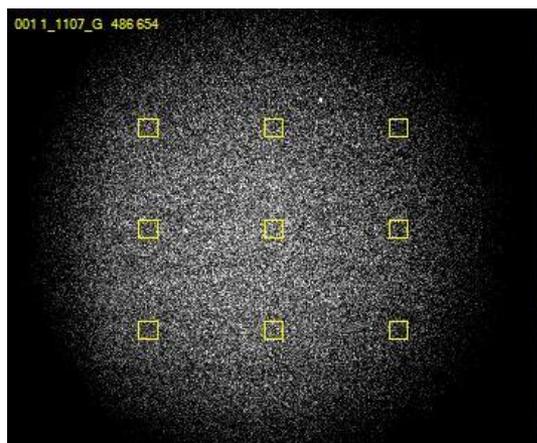
| Read 2 (I) |       |                 |                |                  |           |              |           |           |   |
|------------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|---|
| Lane       | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30  | Yield (G) |   |
| 1          | 38    | 1307 +/- 169    | 0.00 +/- 0.00  | 0.000 / 0.000    | 30.06     | 0.00         | NaN (非数値) | 0.00      | 0 |

| Read 3 |       |                 |                |                  |           |              |           |           |   |
|--------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|---|
| Lane   | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30  | Yield (G) |   |
| 1      | 38    | 1307 +/- 169    | 0.00 +/- 0.00  | 0.000 / 0.000    | 30.06     | 0.00         | NaN (非数値) | 0.00      | 0 |

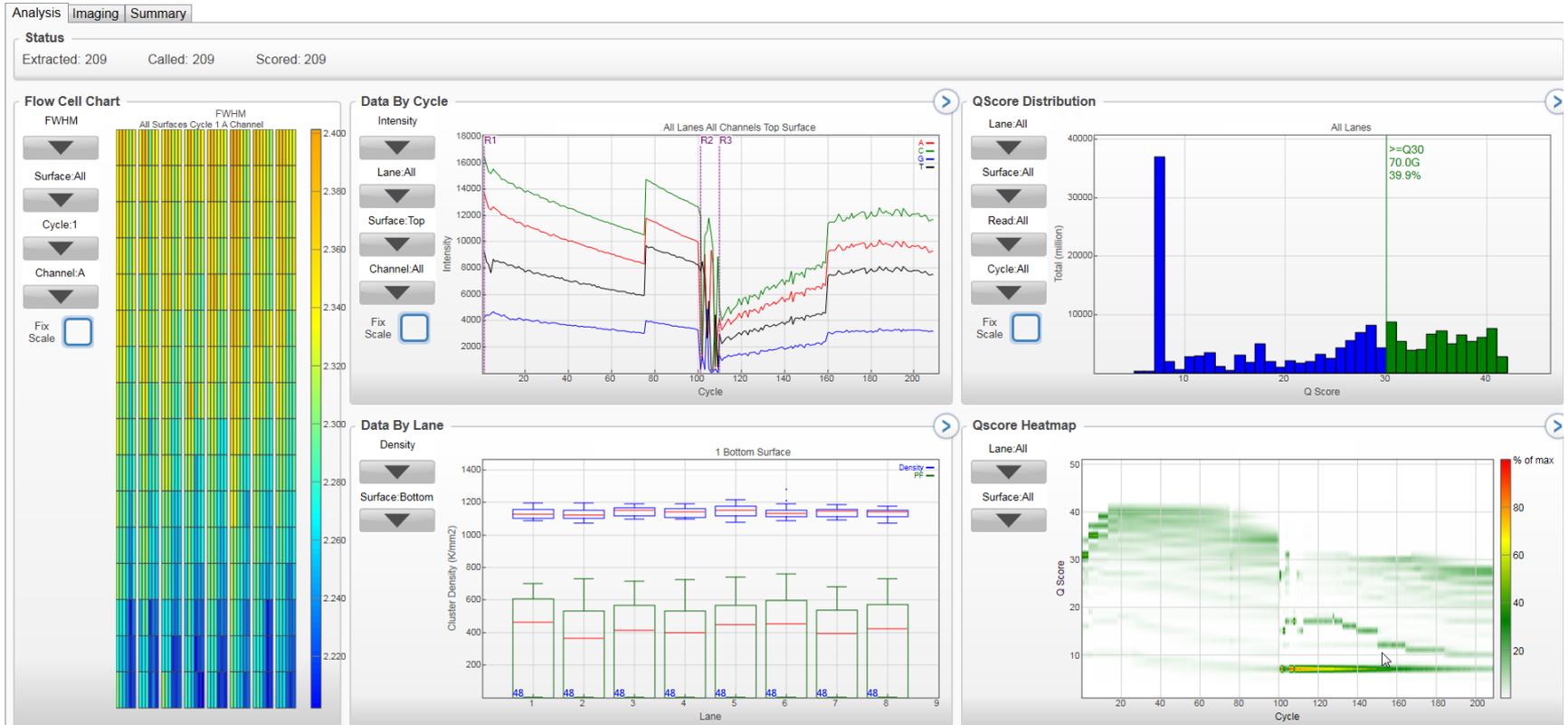
- ▶ Cluster Densityは推奨の密度を保っている (MiSeq v3 : ~1400K/mm2)
- ▶ しかし、PFの値はゼロ、Q scoreが算出されていない

## Case 1\_\_MiSeq V3試薬 (300 PE run)



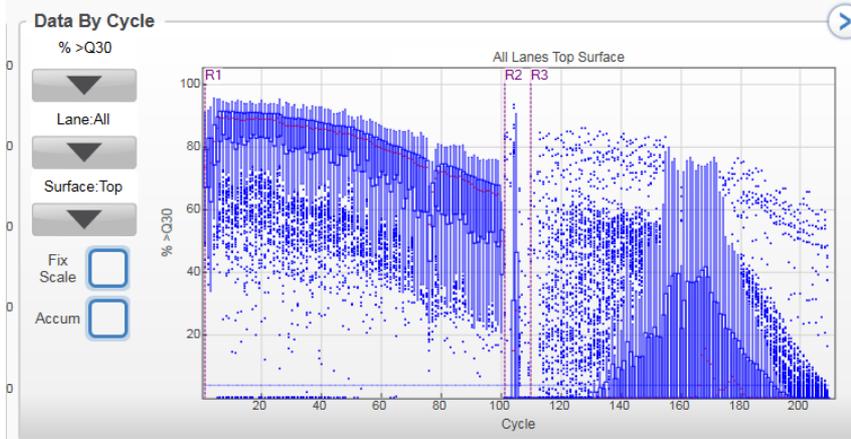
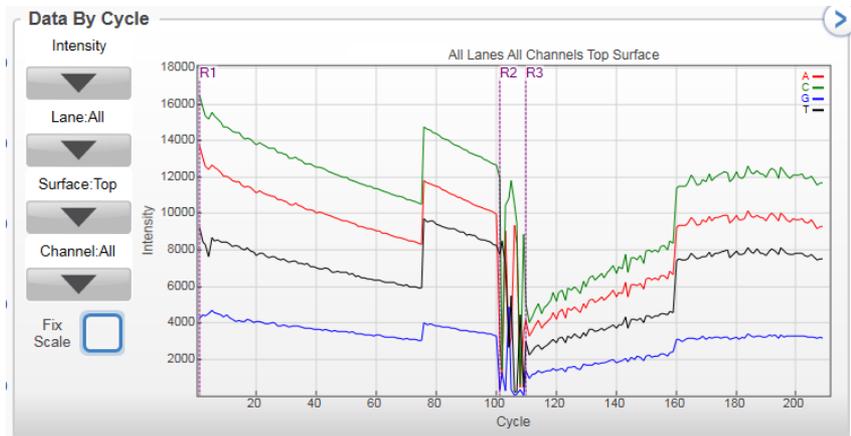
- ▶ 画像を確認するとオーバークラスター
- ▶ 最初の数サイクルでIntensityが下がるのはオーバークラスターの典型的な症状
- ▶ オーバークラスターの際にはクラスター密度は正しく計算されていないことがある

# Case 2\_\_HiSeq V3 High Output (100PE run)



- ▶ Read2のIntensityに乱れ
- ▶ PF、Q scoreにも低下がみられる

## Case 2\_\_HiSeq V3 High Output (100PE run)



- ▶ Q score ( $\geq Q30$ ) においても Read1と比較して、Read2で激しい低下が見られる

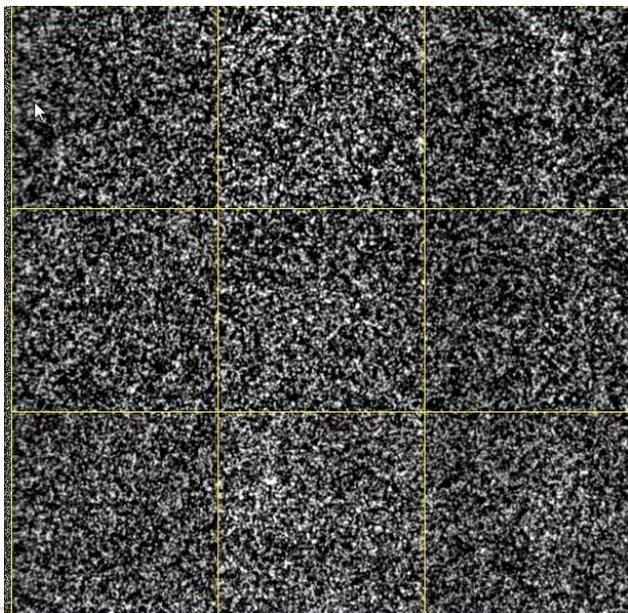
## Case 3\_\_HiSeq V3 High Output (PE run)

| Analysis | Imaging | Summary                      |                 |
|----------|---------|------------------------------|-----------------|
| Lane     | Tiles   | Density (K/mm <sup>2</sup> ) | Cluster PF (%)  |
| 1        | 96      | 1139 +/- 36                  | 33.08 +/- 22.77 |
| 2        | 96      | 1136 +/- 36                  | 29.22 +/- 23.24 |
| 3        | 96      | 1144 +/- 29                  | 31.83 +/- 23.74 |
| 4        | 96      | 1142 +/- 34                  | 30.72 +/- 23.20 |
| 5        | 96      | 1138 +/- 35                  | 33.77 +/- 22.67 |
| 6        | 96      | 1138 +/- 37                  | 38.33 +/- 22.96 |
| 7        | 96      | 1136 +/- 27                  | 33.70 +/- 23.49 |
| 8        | 96      | 1140 +/- 30                  | 33.21 +/- 21.73 |

▶ 推奨よりも高いクラスター密度 ( HiSeq V3 High Output : 750 ~ 850K/mm<sup>2</sup>)

▶ オーバークラスターの際にはRead2の方が激しくQ scoreを落とす傾向がある

(クラスターサイズがRead1よりも大きくなるため)

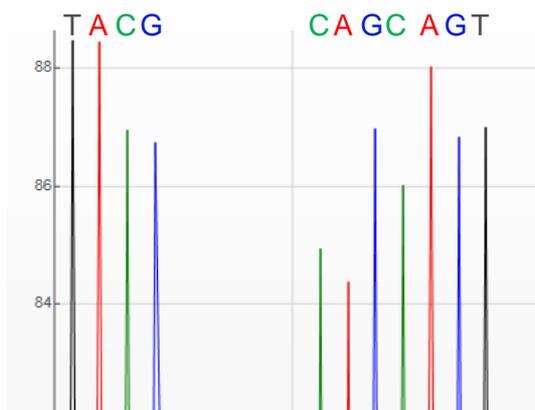
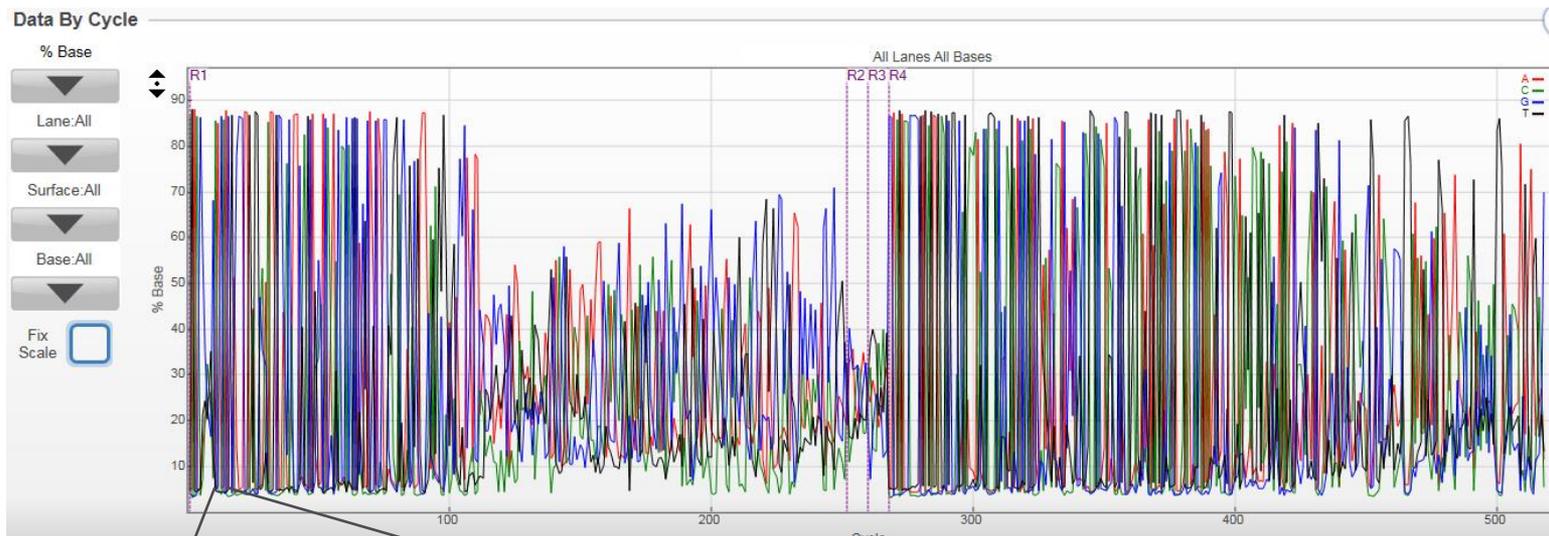


# Case 3\_\_MiSeq V2試薬 (250 PE run)

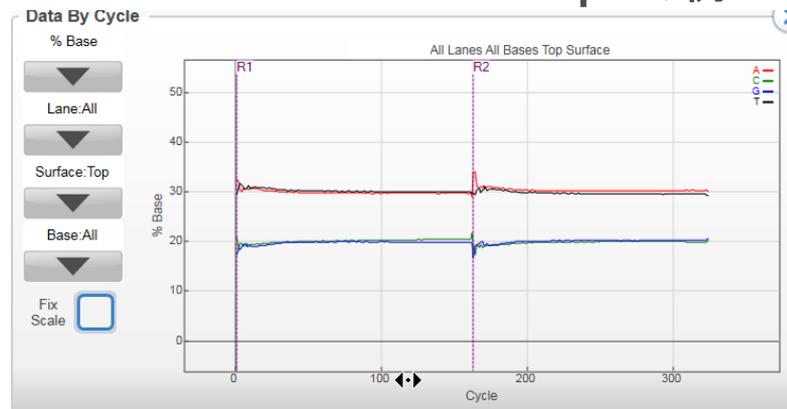


- ▶ Intensityに乱れ
- ▶ PF、Q scoreにも低下がみられる

# Case 3\_\_MiSeq V2試薬 (250 PE run)



## Whole Genome Sampleの例



# Case 3\_\_MiSeq V2試薬 (250 PE run)

| Read 1     |       |                 |                |                  |           |              |          |           |                  |                |                |                         |                         |                          |                   |  |
|------------|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------|-----------|------------------|----------------|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|--|
| Lane       | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Aligned (%)    | Error Rate (%) | Error Rate 35 cycle (%) | Error Rate 75 cycle (%) | Error Rate 100 cycle (%) | Intensity Cycle 1 |  |
| 1          | 28    | 1215 +/- 71     | 16.13 +/- 5.28 | -1.196 / -1.946  | 24.26     | 3.86         | 61.4     | 1.0       | 0 - 250          | 11.96 +/- 3.00 | 1.67 +/- 0.22  | 1.56 +/- 0.43           | 1.05 +/- 0.24           | 0.99 +/- 0.21            | 32 +/- 2          |  |
| Read 2 (I) |       |                 |                |                  |           |              |          |           |                  |                |                |                         |                         |                          |                   |  |
| Lane       | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Aligned (%)    | Error Rate (%) | Error Rate 35 cycle (%) | Error Rate 75 cycle (%) | Error Rate 100 cycle (%) | Intensity Cycle 1 |  |
| 1          | 28    | 1215 +/- 71     | 16.13 +/- 5.28 | 0.266 / -0.027   | 24.26     | 3.86         | 72.3     | 0.0       | 0                | 0.00 +/- 0.00  | 0.00 +/- 0.00  | 0.00 +/- 0.00           | 0.00 +/- 0.00           | 0.00 +/- 0.00            | 84 +/- 10         |  |
| Read 3 (I) |       |                 |                |                  |           |              |          |           |                  |                |                |                         |                         |                          |                   |  |
| Lane       | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Aligned (%)    | Error Rate (%) | Error Rate 35 cycle (%) | Error Rate 75 cycle (%) | Error Rate 100 cycle (%) | Intensity Cycle 1 |  |
| 1          | 28    | 1215 +/- 71     | 16.13 +/- 5.28 | 1.626 / -0.058   | 24.26     | 3.86         | 75.2     | 0.0       | 0                | 0.00 +/- 0.00  | 0.00 +/- 0.00  | 0.00 +/- 0.00           | 0.00 +/- 0.00           | 0.00 +/- 0.00            | 186 +/- 19        |  |
| Read 4     |       |                 |                |                  |           |              |          |           |                  |                |                |                         |                         |                          |                   |  |
| Lane       | Tiles | Density (K/mm2) | Cluster PF (%) | Phas/Prephas (%) | Reads (M) | Reads PF (M) | % >= Q30 | Yield (G) | Cycles Err Rated | Aligned (%)    | Error Rate (%) | Error Rate 35 cycle (%) | Error Rate 75 cycle (%) | Error Rate 100 cycle (%) | Intensity Cycle 1 |  |
| 1          | 28    | 1215 +/- 71     | 16.13 +/- 5.28 | 0.566 / 0.200    | 24.26     | 3.86         | 55.3     | 1.0       | 0 - 250          | 15.06 +/- 3.55 | 4.03 +/- 0.59  | 0.28 +/- 0.14           | 0.41 +/- 0.20           | 0.52 +/- 0.26            | 25 +/- 1          |  |

- ▶ 偏りのあるサンプルの場合は、クラスター密度の影響を受けやすくなり、MiSeqのランで1000K/mm2を超えると激しくQ scoreを落とす
- ▶ **MCS v2.3**以上で、クラスター密度を**800K/mm<sup>2</sup>**程度に抑えていただき、**5~20%程度**PhiXを入れていただくことを推奨
  - 16S rRNA メタゲノム解析のポイント プロトコールのご紹介 (2014/5/9 サポート ウェビナー)

[http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2014\\_techsupport\\_session3.pdf](http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2014_techsupport_session3.pdf)

## その他リソース情報

- ▶ SAVサポートページ

[http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/sequencing\\_analysis\\_viewer\\_sav.ilmn](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.ilmn)

- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV) User Guide

[https://support.illumina.com/downloads/sequencing\\_analysis\\_viewer\\_user\\_guide\\_15020619.html](https://support.illumina.com/downloads/sequencing_analysis_viewer_user_guide_15020619.html)

- ▶ TechSupport Bulletin (Myilluminaのアカウントが必要です)

<https://my.illumina.com/Home/Index>

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)にお問い合わせください