

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

Sep 18, 2015



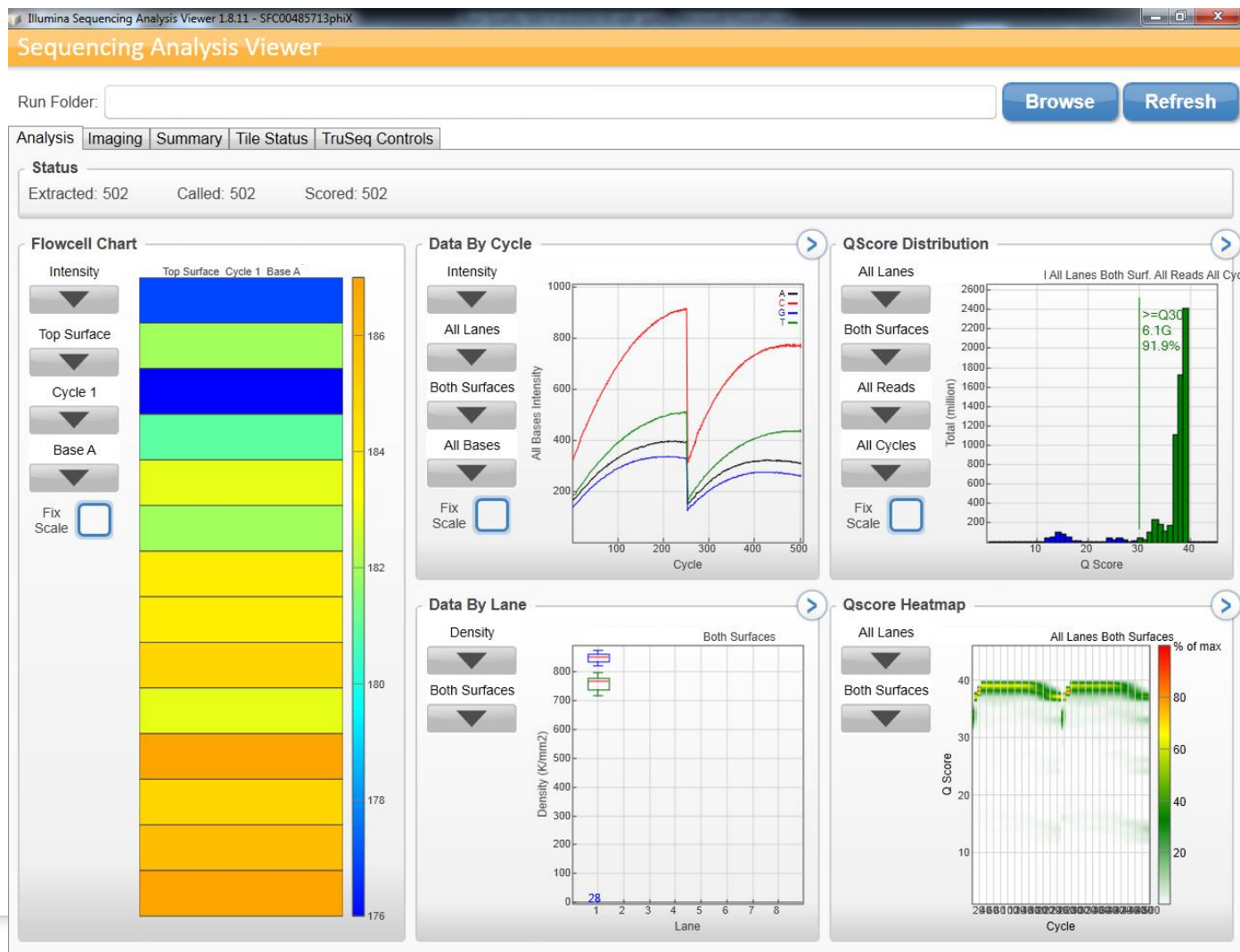
山重 リエ
イリミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 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

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".

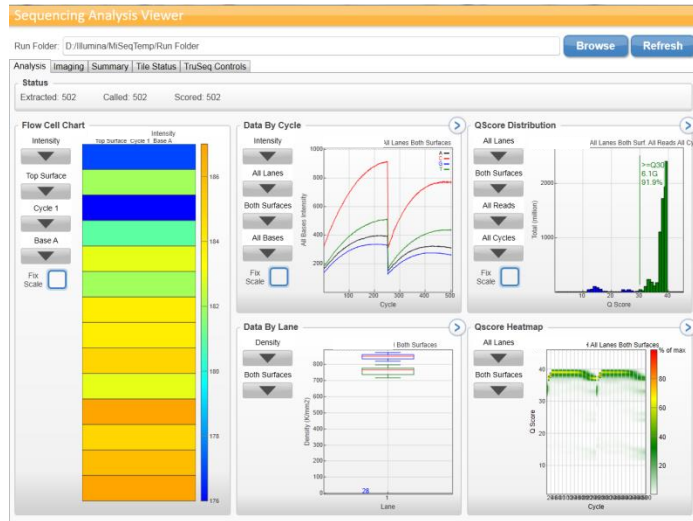
On the left side, a red box labeled "1" highlights the "Run Folder" input field, which contains the path "D://illumina/MiSeqTemp/Run Folder". To the right of this field are "Browse" and "Refresh" buttons. The "Refresh" button is also highlighted with a red box and a circled "2".

Below the input field, there are tabs for "Analysis", "Imaging", "Summary", "Tile Status", and "TruSeq Controls". The "Summary" tab is currently selected.

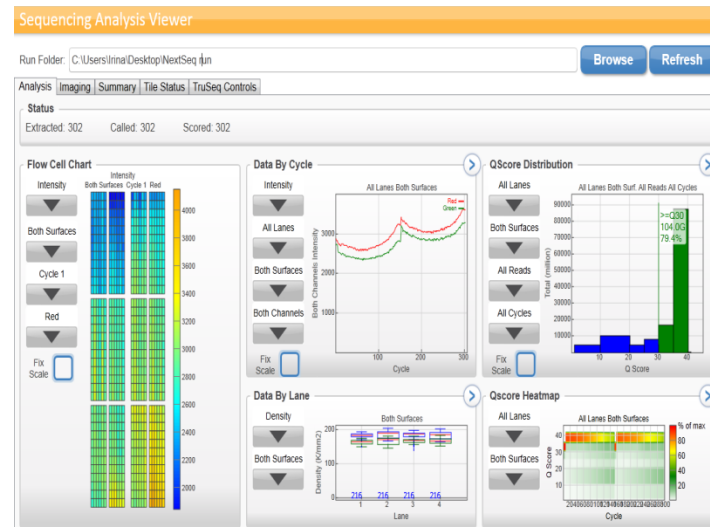
The main content area is divided into several sections:

- Status:** Shows "Extracted: 0", "Called: 0", and "Scored: 0".
- Flow Cell Chart:** A grid of vertical bars representing the flow cell. It includes dropdown menus for "Intensity", "Top Surface", "Cycle 1", and "Base A", and a "Fix Scale" checkbox.
- Data By Cycle:** A chart showing intensity over cycles. It includes dropdown menus for "Intensity", "All Lanes", "Both Surfaces", and "All Bases", and a "Fix Scale" checkbox.
- QScore Distribution:** A chart showing the distribution of Q-scores. It includes dropdown menus for "All Lanes", "Both Surfaces", "All Reads", and "All Cycles", and a "Fix Scale" checkbox.
- Data By Lane:** A chart showing density across lanes. It includes dropdown menus for "Density" and "Both Surfaces".
- Qscore Heatmap:** A heatmap showing Q-scores across lanes. It includes dropdown menus for "All Lanes" and "Both Surfaces".

装置によって、SAVのデータの見た目が異なります



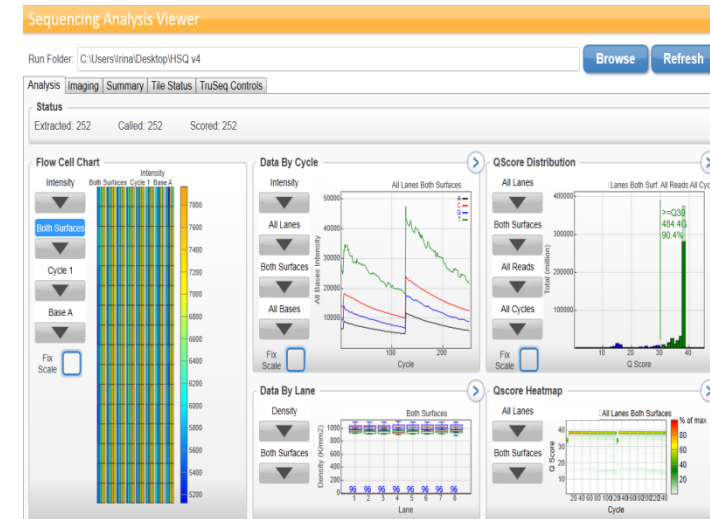
MiSeq



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

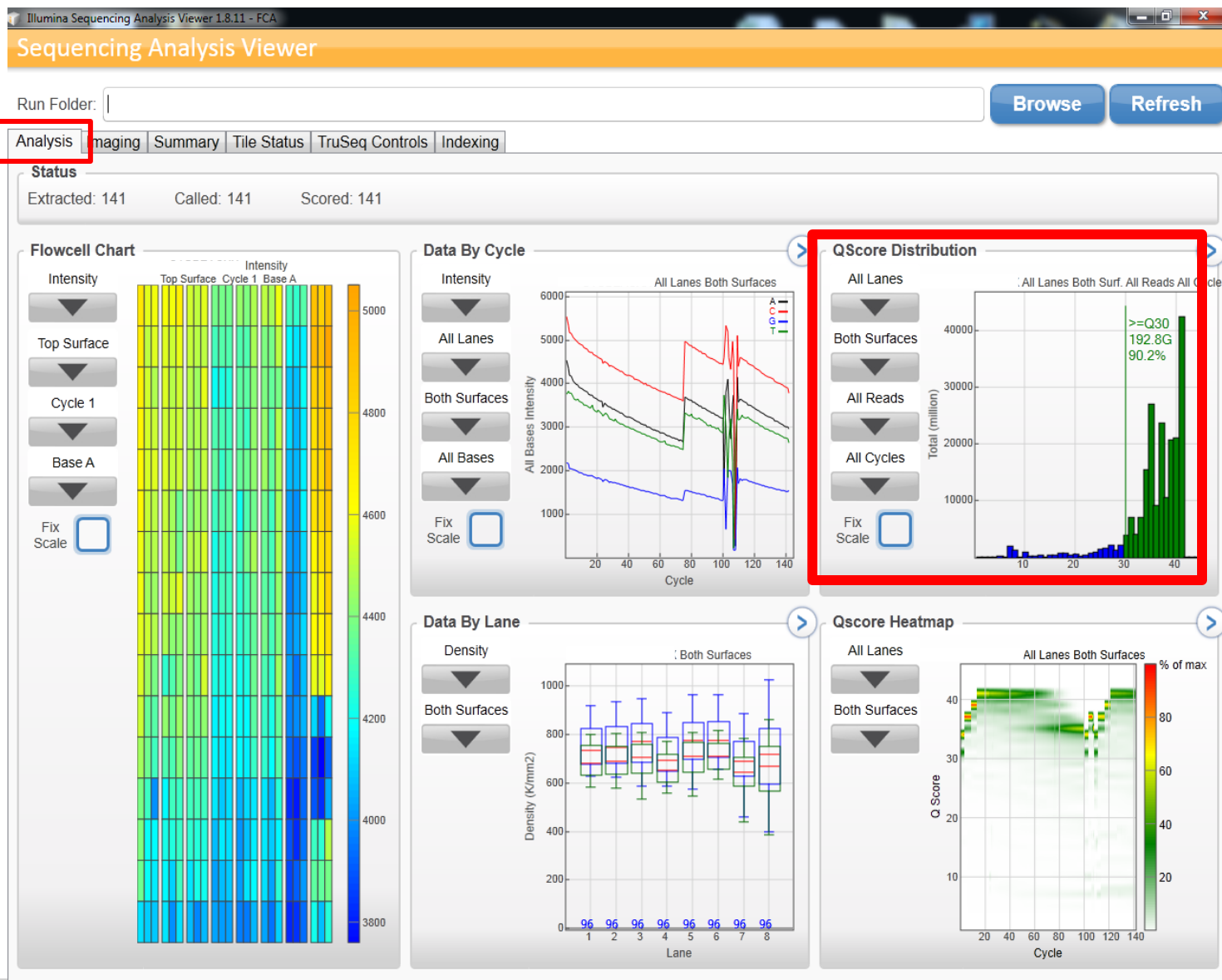
Understanding Quality Score:

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

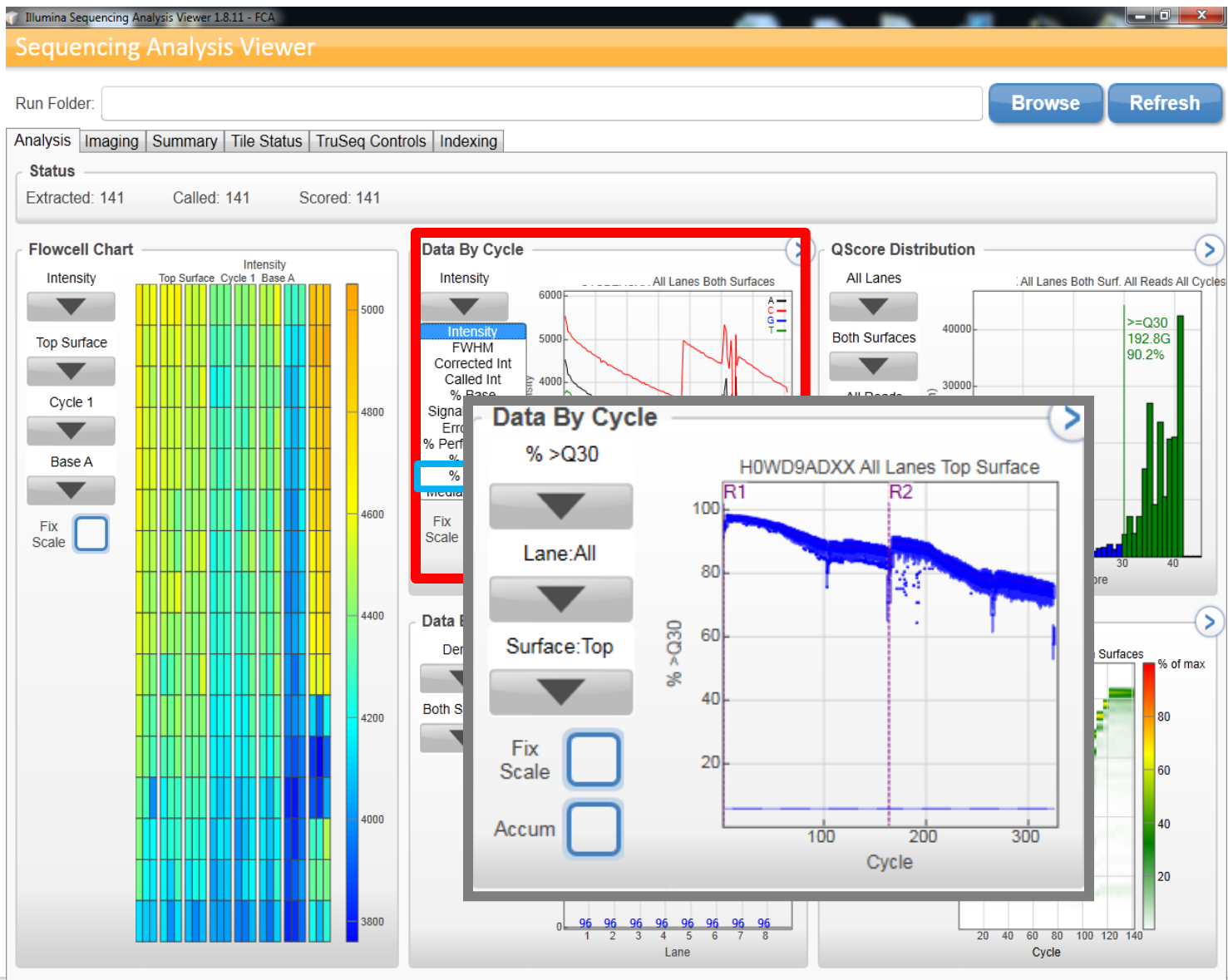
Quality Scores for Next-Generation Sequencing

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 HO SBS V3	$\geq 85\%$	N/A	$\geq 80\%$	N/A	N/A	N/A	N/A
HiSeq HO SBS V4	$\geq 85\%$	N/A	$\geq 80\%$	$\geq 80\%$	N/A	N/A	N/A
HiSeq 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 ²
HiSeq 2000/2500 High Output v3	12.0 pM	750-850K clusters/mm ²
HiSeq 2500 High Output v4	18.0 pM	950-1050K clusters/mm ²
HiSeq 2500 Rapid Run v1 and v2	12.0 pM	850-1000K clusters/mm ²
MiSeq v2	12.5 pM	1000-1200K clusters/mm ²
MiSeq v3	15-20 pM	1200-1400K clusters/mm ²
NextSeq 500 NextSeq Control Software v1.2 or earlier	3.0 pM	170-220K clusters/mm ²
NextSeq 500 NextSeq Control Software v1.3 or later	1.8 pM	170-220K clusters/mm ²

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

- 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

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

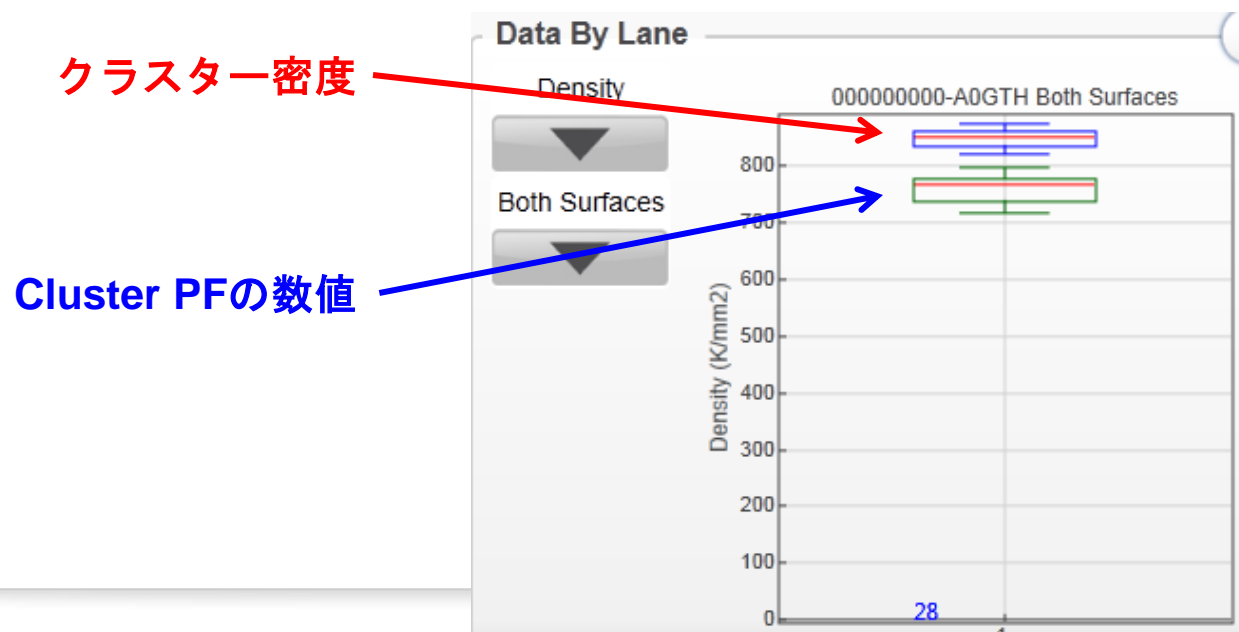
適正なクラスター密度を狙って、実験を行うことが重要

- ▶ 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）

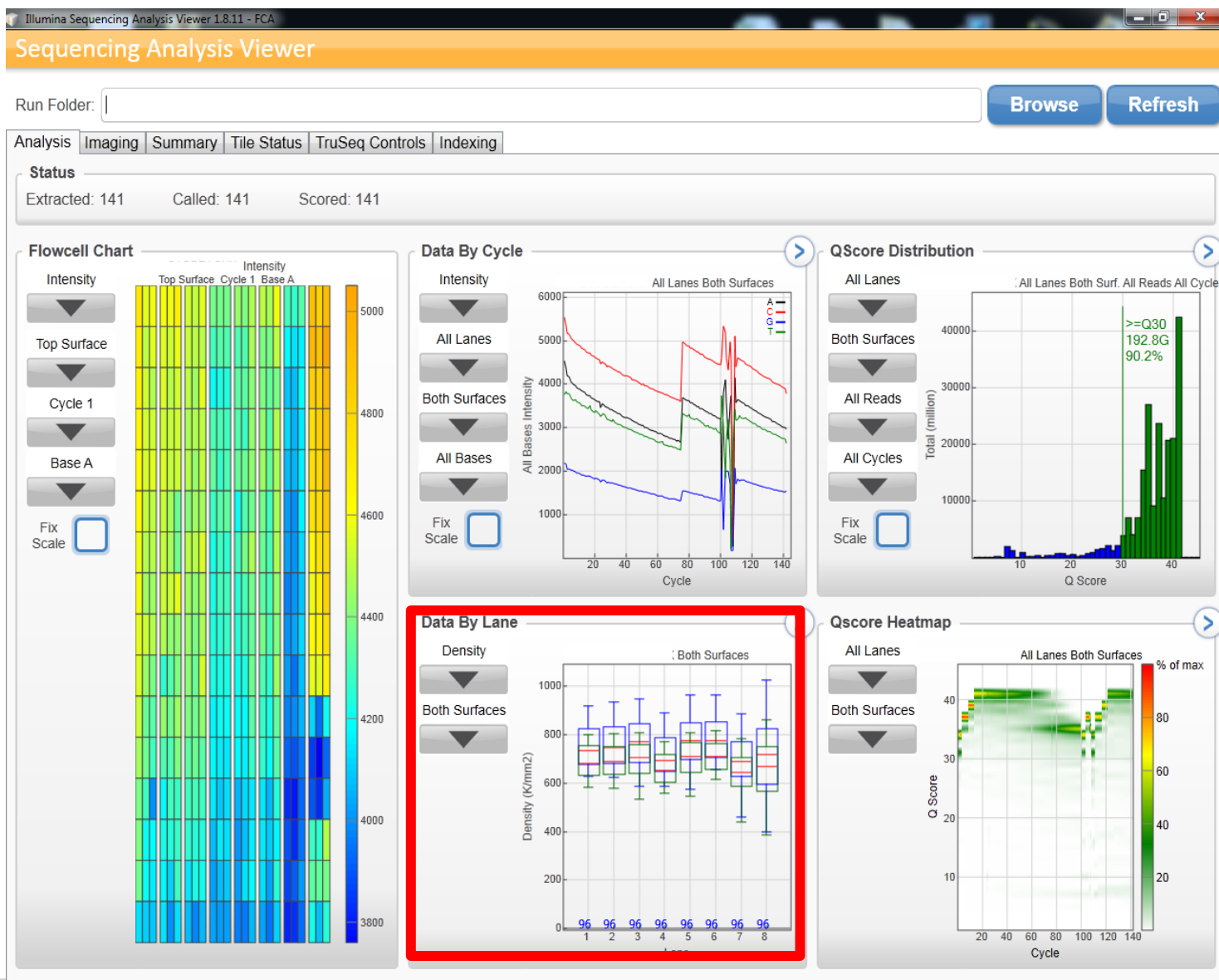
https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/u2a5_szu_U6m0GkgddS6Vg/phi-x-loading-concentrations-for-verification-runs

- ▶ %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



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 ²)	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 ²)	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

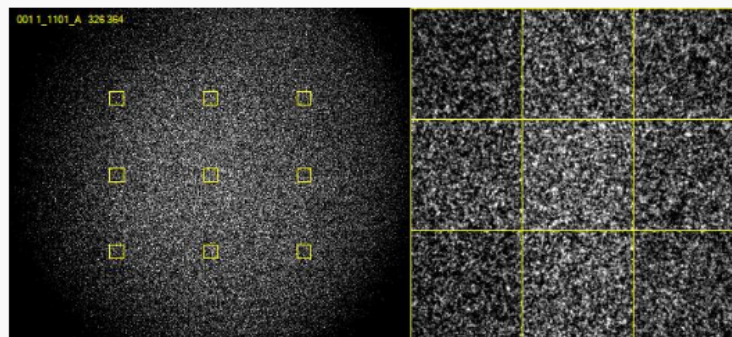
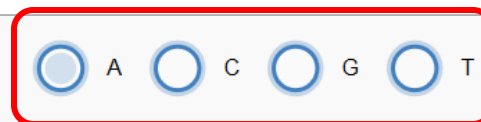
Analysis | Imaging | Summary

Cycle All Surface All Read All Tile Number All

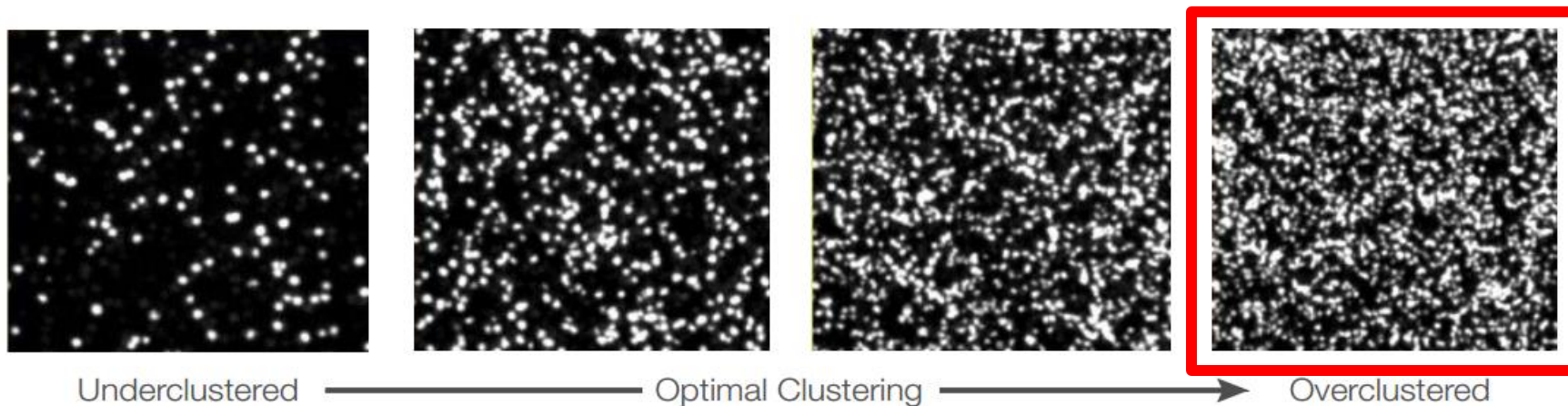


Lane	Tile	Cycle	Density (k/mm2)	Density Pf (k/mm2)	Cluster Count (k)	Cluster Count Pf (k)	% Pass Filter
1	1101	1	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	2	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	3	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	4	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	5	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	6	1093.4	0	737.4	0	0
1	1101	7	1093.4	0	737.4	0	0
1	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



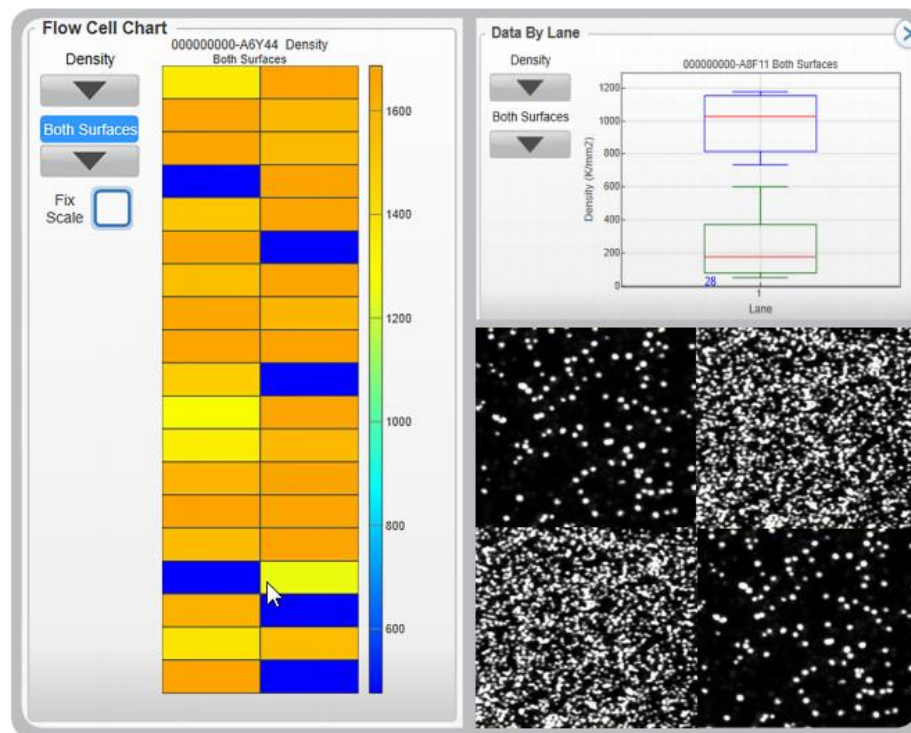
クラスター密度が高すぎる画像の例



- ▶ 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

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

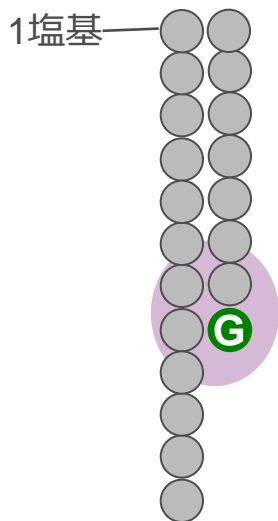
- ▶ クオリティスコア (%Q30)
- ▶ クラスタ密度
- ▶ Cluster Passing Filter (PF)
- ▶ Phasing/Prephasing
- ▶ FWHM

Phasing/Prephasingについて

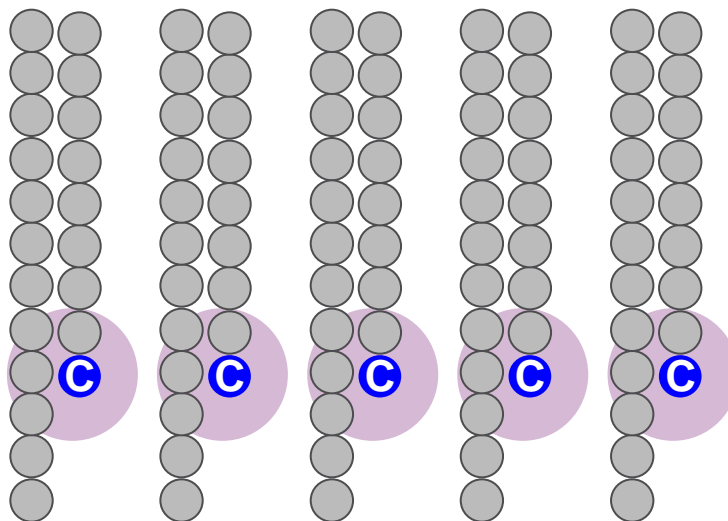
- ▶ Sequencing は化学反応で進むので、一部の塩基が①遅れたり、逆に②進みすぎたりする
→ 前後の塩基の情報から補正を行う

①反応が遅れたDNA

Phasing

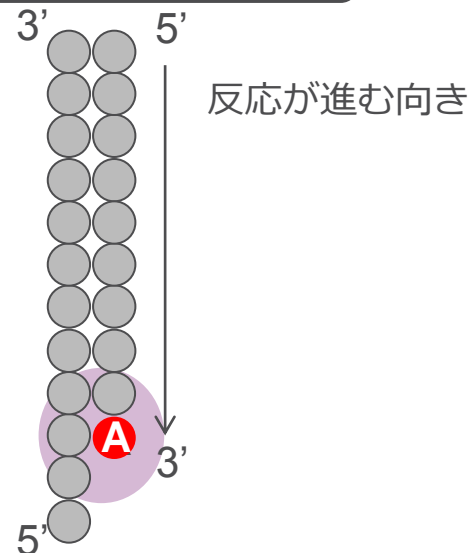


理想的に反応しているDNA



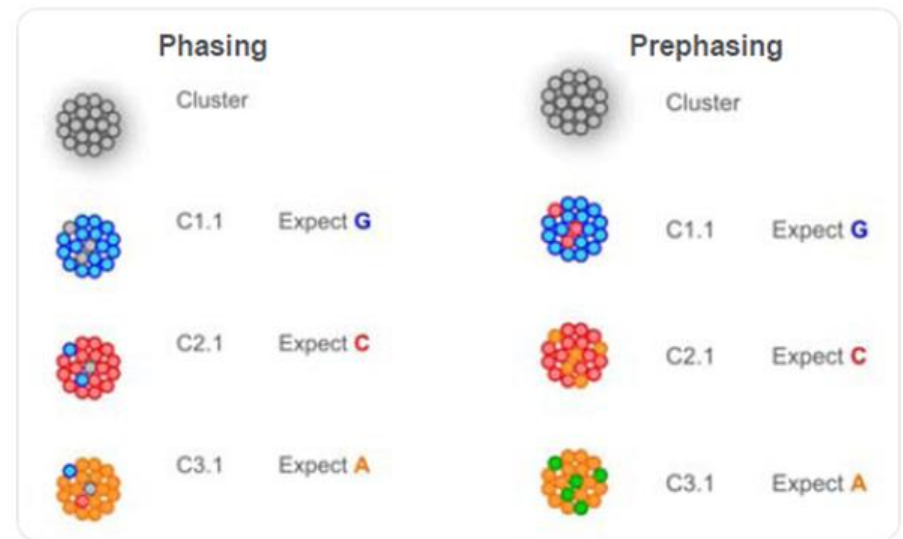
②反応が進みすぎたDNA

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 ²)	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 ²)	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

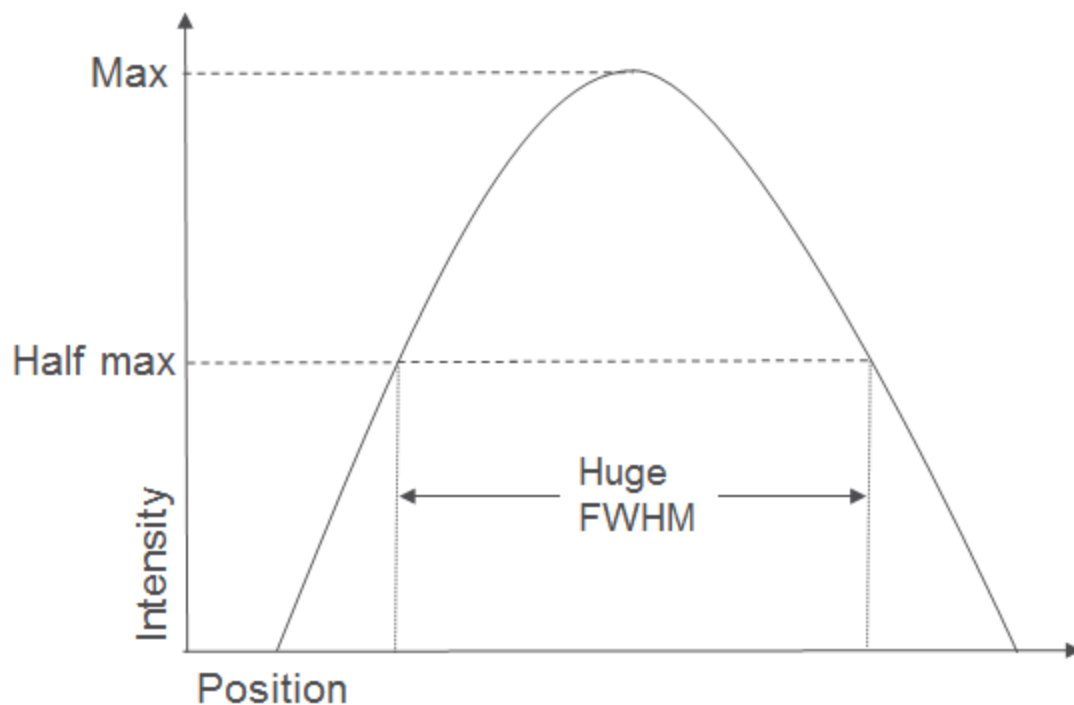
ランの評価で特に重要となる項目

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

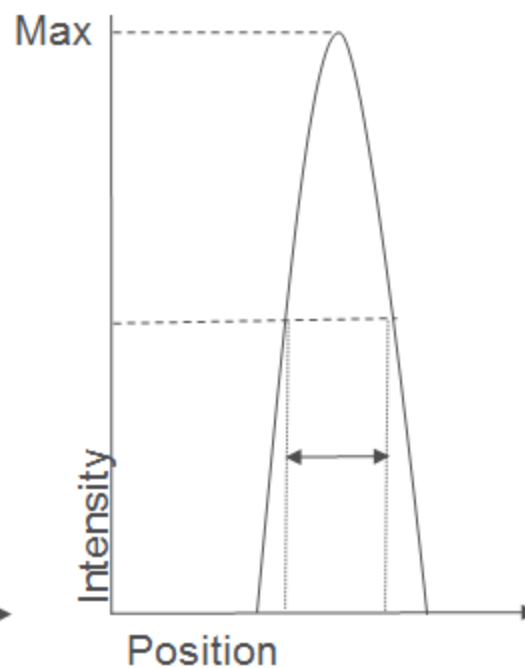
FWHMとは？

▶ 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

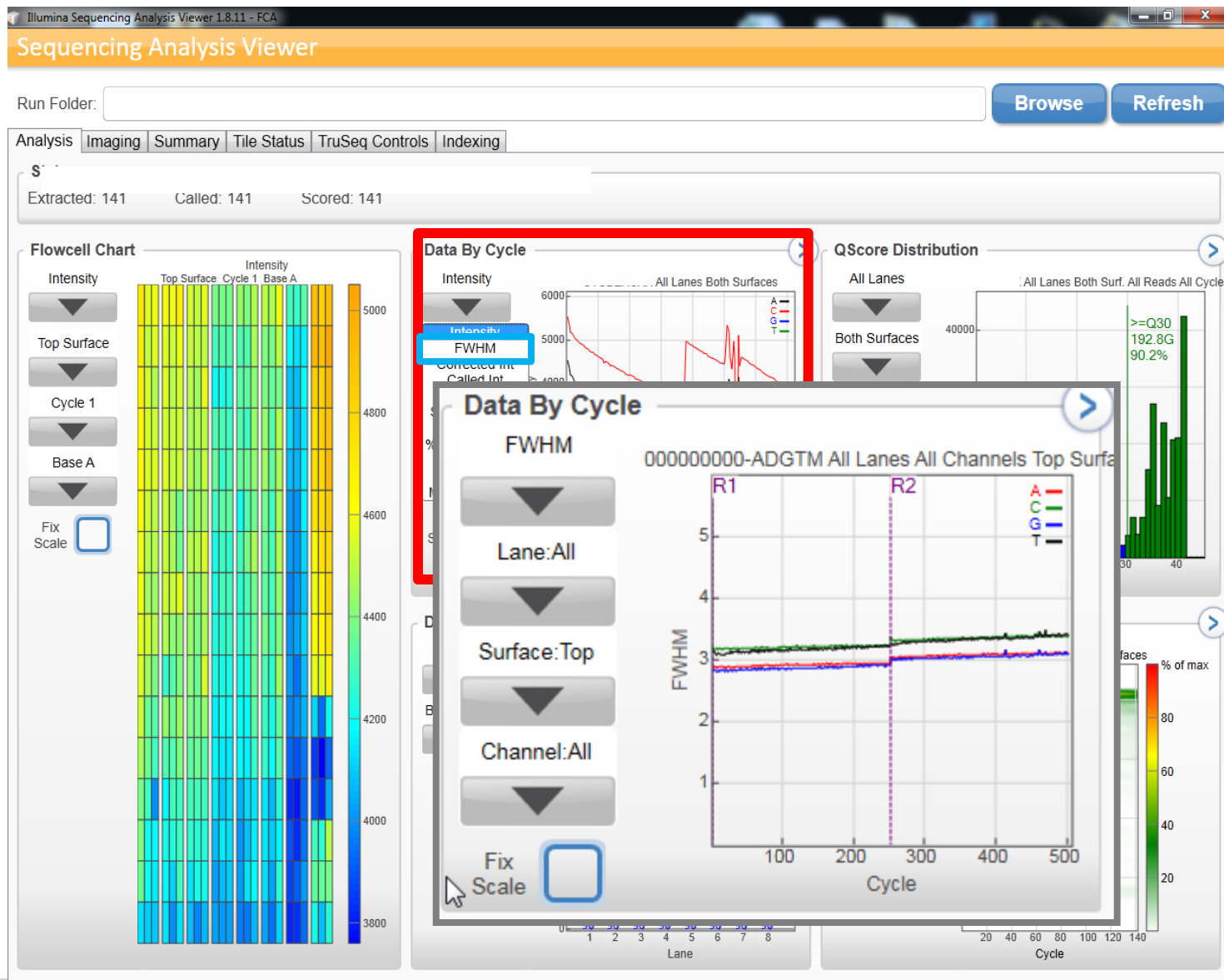


ぼんやりと大きなクラスター



明るくシャープなクラスター

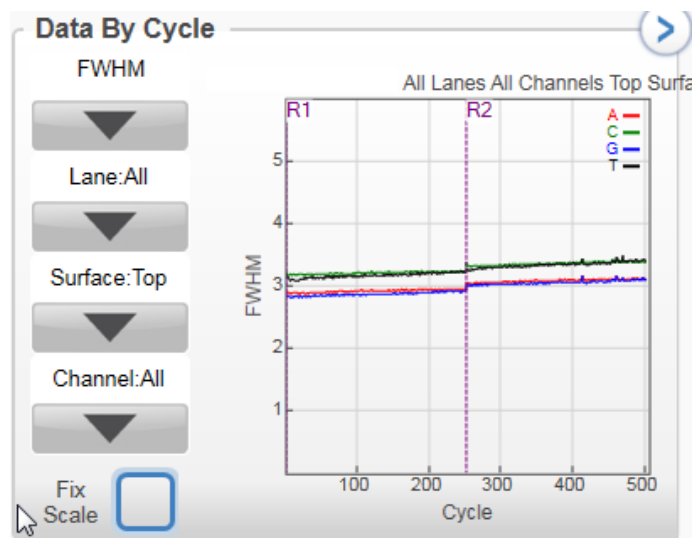
Analysisタブ : Data By Cycle



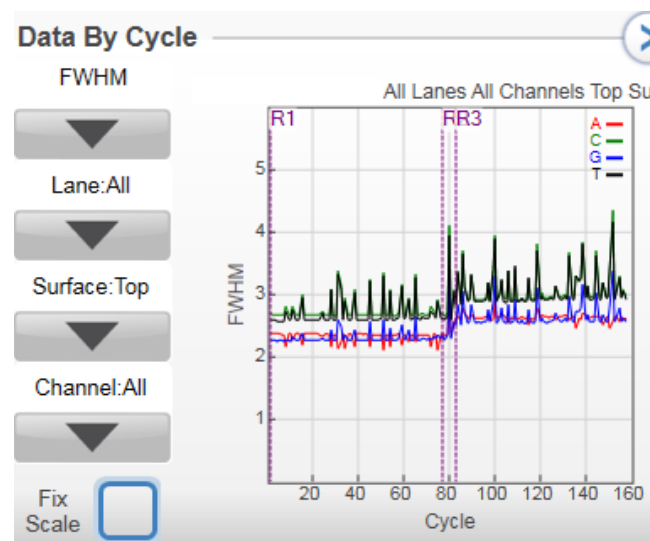
FWHMとは？

▶ 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

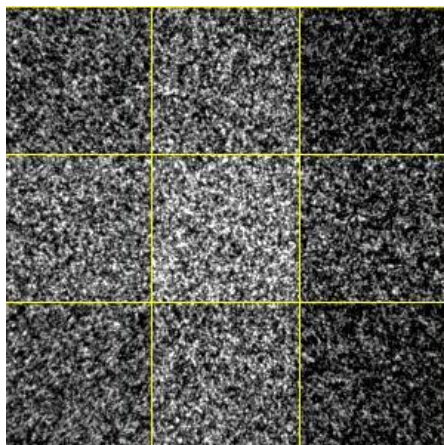
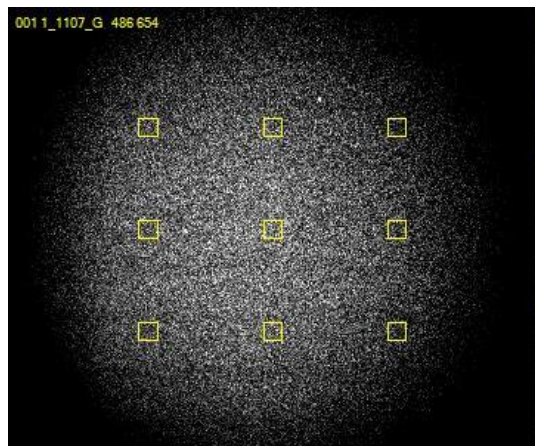
Read 1									
Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads (M)	Reads PF (M)	% >= Q30	Yield (G)	
1	38	1307 +/- 169	0.00 +/- 0.00	0.047 / 0.052	30.06	0.00	NaN (非数値)	0.00	0

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

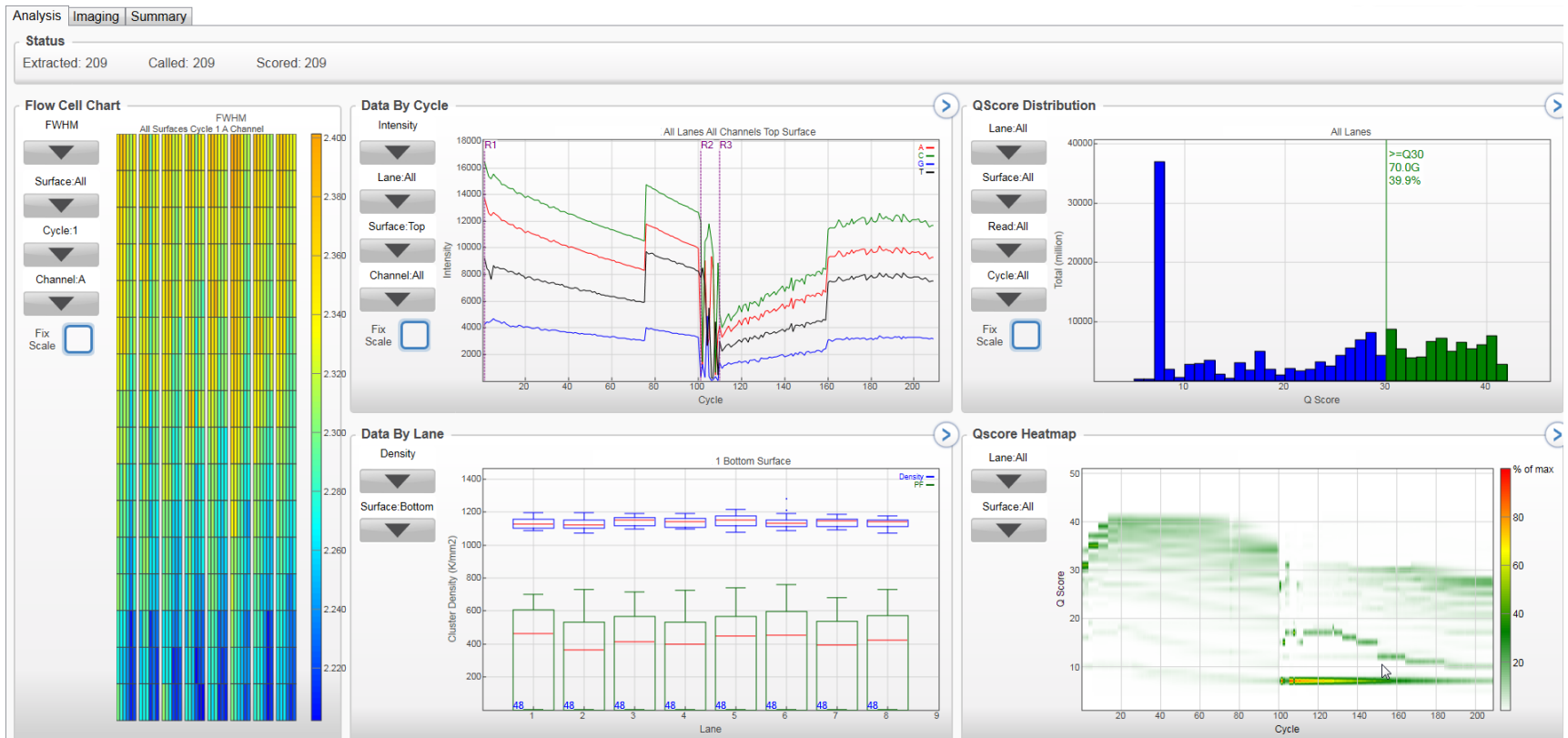
- ▶ Cluster Densityは推奨の密度を保っている (MiSeq v3 : ~1400K/mm2)
- ▶ しかし、PFの値はゼロ、Q scoreが算出されていない

Case 1__MiSeq V3試薬 (300 PE run)



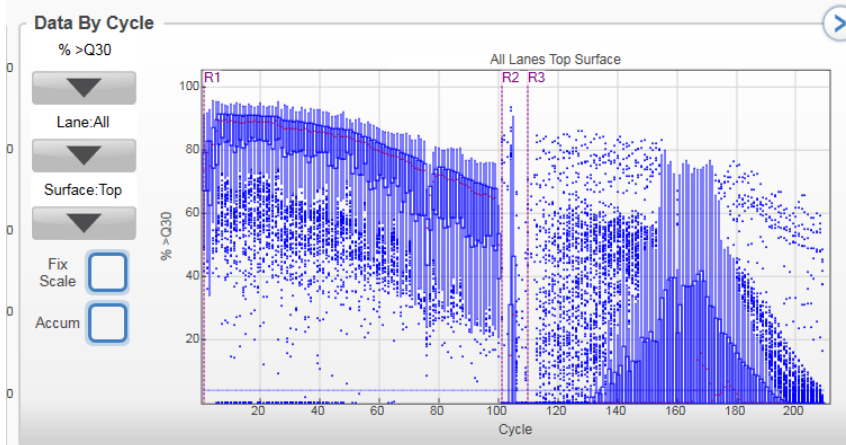
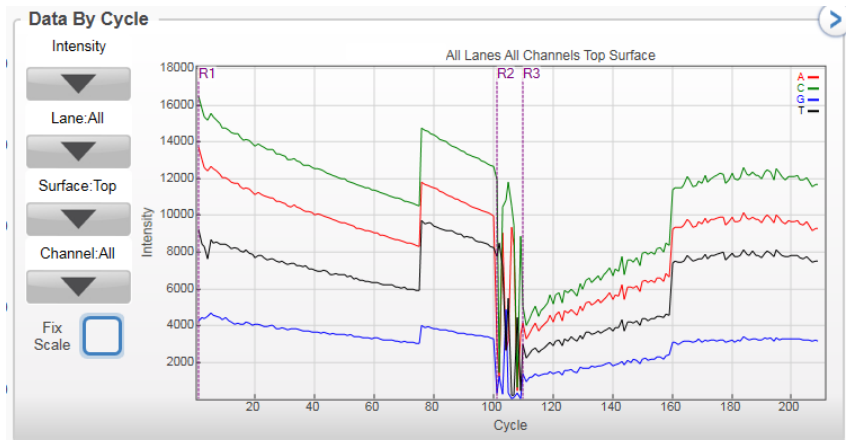
- ▶ 画像を確認するとオーバークラスター
- ▶ 最初の数サイクルでIntensityが下がるのはオーバークラスターの典型的な症状
- ▶ オーバークラスターの際にはクラスター密度は正しく計算されていないことがある

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

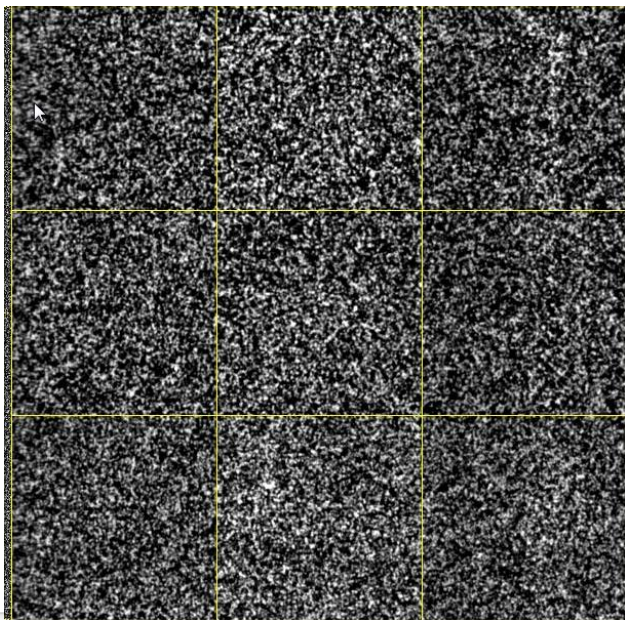
Case 3__HiSeq V3 High Output (PE run)

Analysis	Imaging	Summary	
Lane	Tiles	Density (K/mm ²)	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

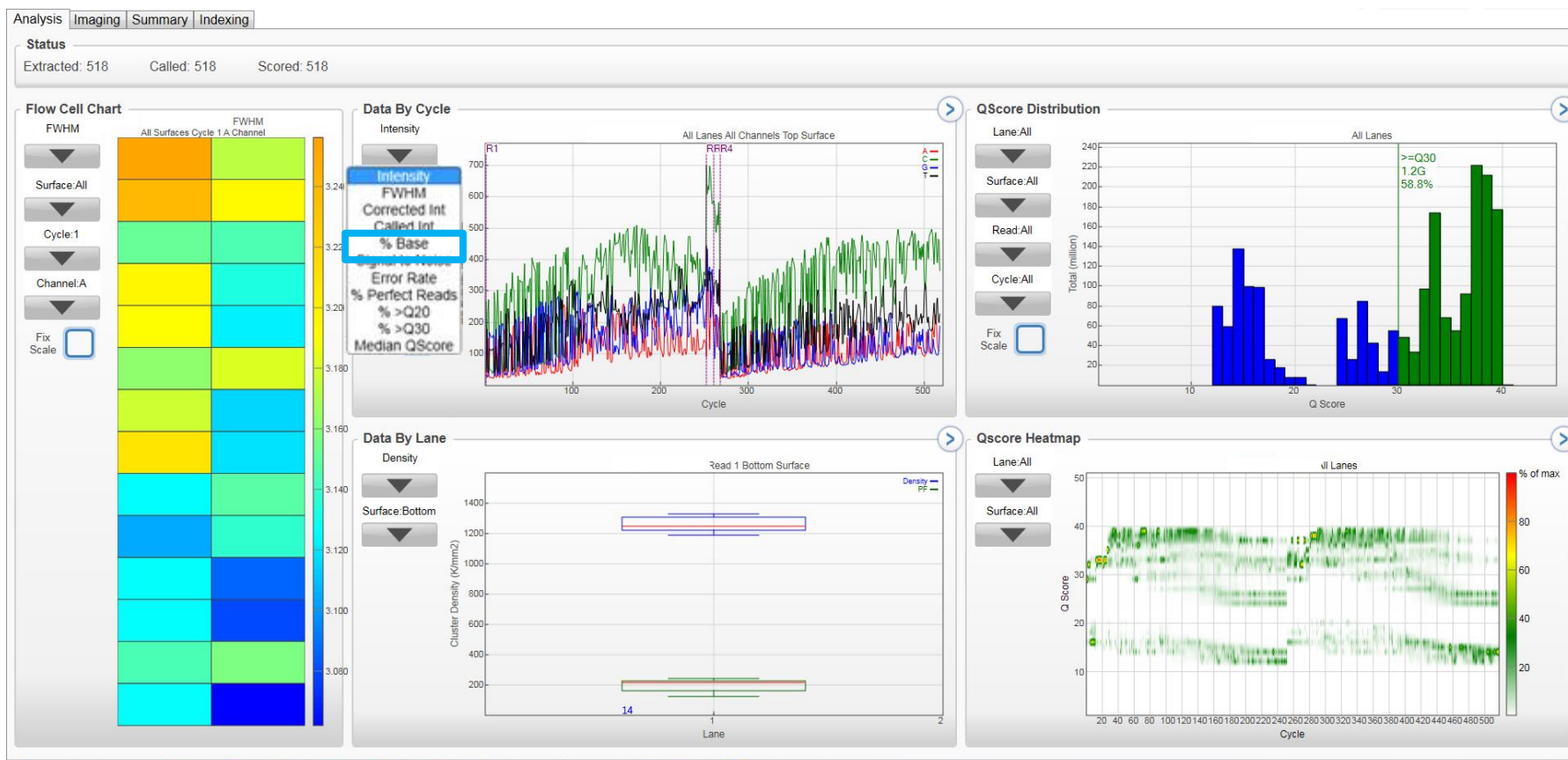
▶ 推奨よりも高いクラスター密度 (HiSeq V3 High Output : 750 ~ 850K/mm²)

▶ 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)

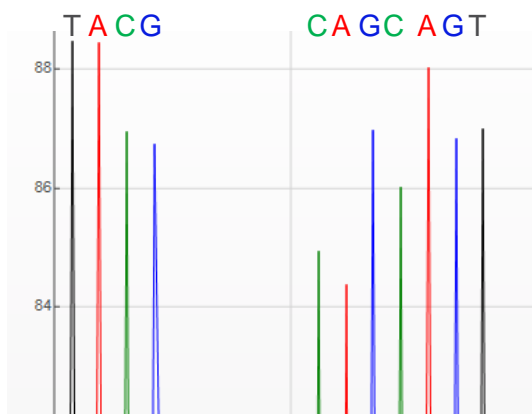
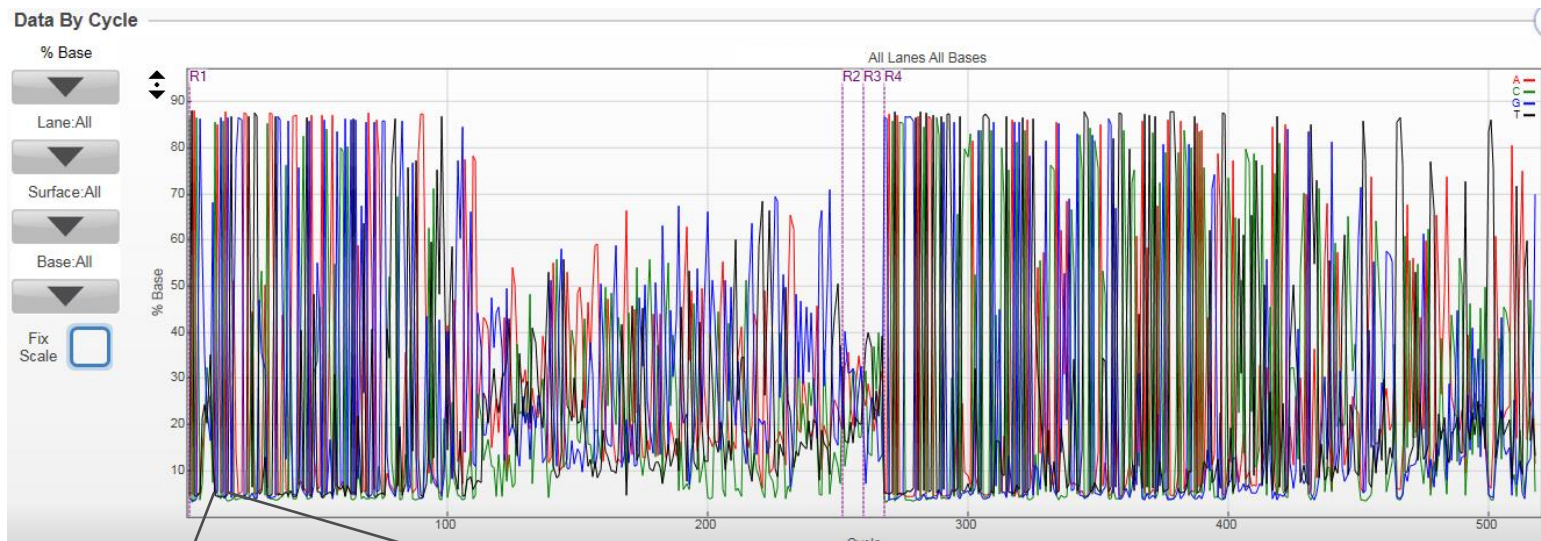


Case 3__MiSeq V2試薬 (250 PE run)

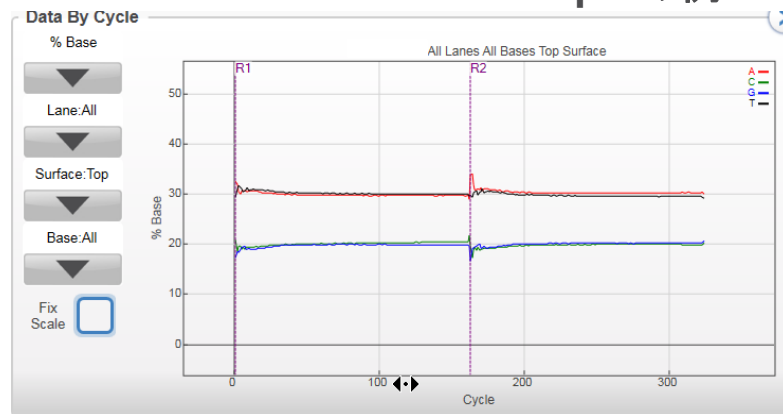


- ▶ Intensityに乱れ
- ▶ PF、Q scoreにも低下がみられる

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/mm²**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

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

- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV) User Guide

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にお問い合わせください