

MiSeq Reporter (MSR)をはじめよう

癸生川絵里 (Eri Kibukawa)
Bioinformatics Support Scientist



MiSeq Reporter



© 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®

Outline

- ▶ MiSeq Reporter (MSR) とは？
- ▶ Web インターフェイス
- ▶ OutputフォルダとFASTQ
- ▶ はじめのトラブルシューティング



MiSeq Reporter



Outline

- ▶ MiSeq Reporter (MSR) とは？
- ▶ Web インターフェイス
- ▶ OutputフォルダとFASTQ
- ▶ はじめのトラブルシュート

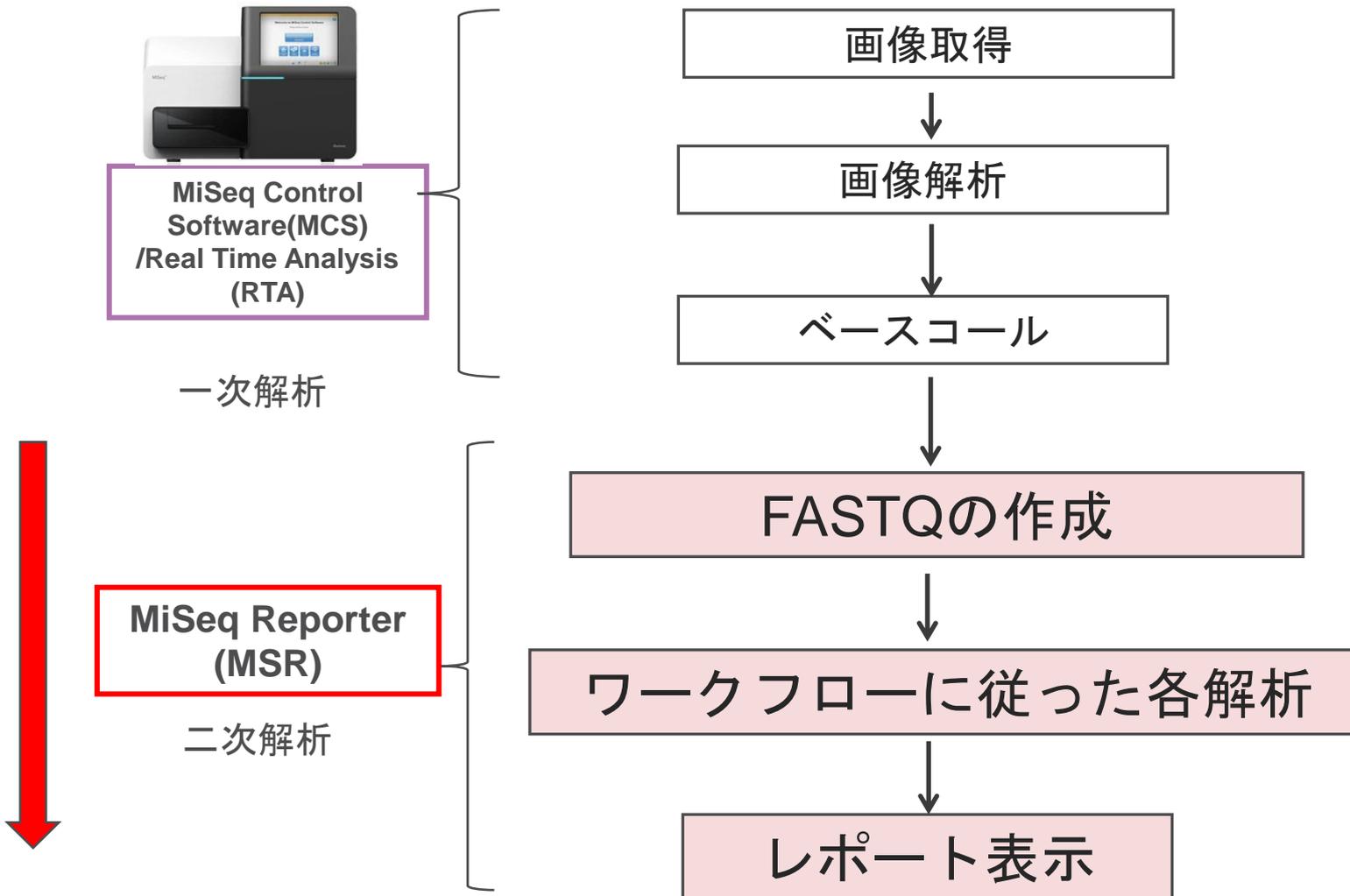


MiSeq Reporter



MiSeq Reporter (MSR)とは?

- ▶ MiSeq のパイプラインで二次解以降を担当するソフトウェアです。



MiSeq Reporter (MSR)とは？

- ▶ MiSeq上では、RTA が一時解析を終了しますと、MSRが自動で後続の解析処理を始めます。
- ▶ サンプルシートにより指定された各解析プロセスを実施します。
- ▶ 過去の解析結果の閲覧や再解析実行もできます。

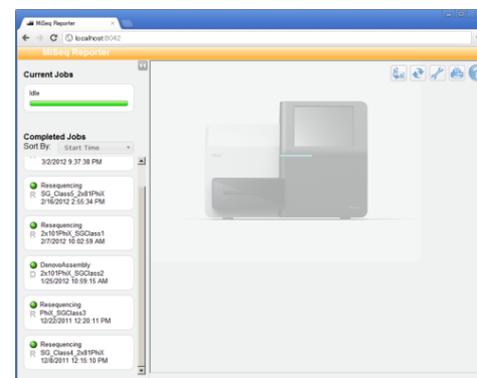
MiSeq Reporter (MSR) の働き方

- ▶ Windowsのサービスとしてバックグラウンドで動いているため、起動のためのデスクトップアイコンなどは置いてありません。

- ▶ Webブラウザからアクセスし操作します。

アドレス例

<http://localhost:8042/>



- ▶ 同じネットワーク上に接続している複数のユーザがWebブラウザで同一MSRを閲覧/操作できます。

MiSeq Reporter (MSR) の動作場所



– on-instrument (MiSeq上)

デフォルトでインストール/設定済み

ラン中は自動でMSRが起動し解析を行います

– off-instrument (別のPC上)

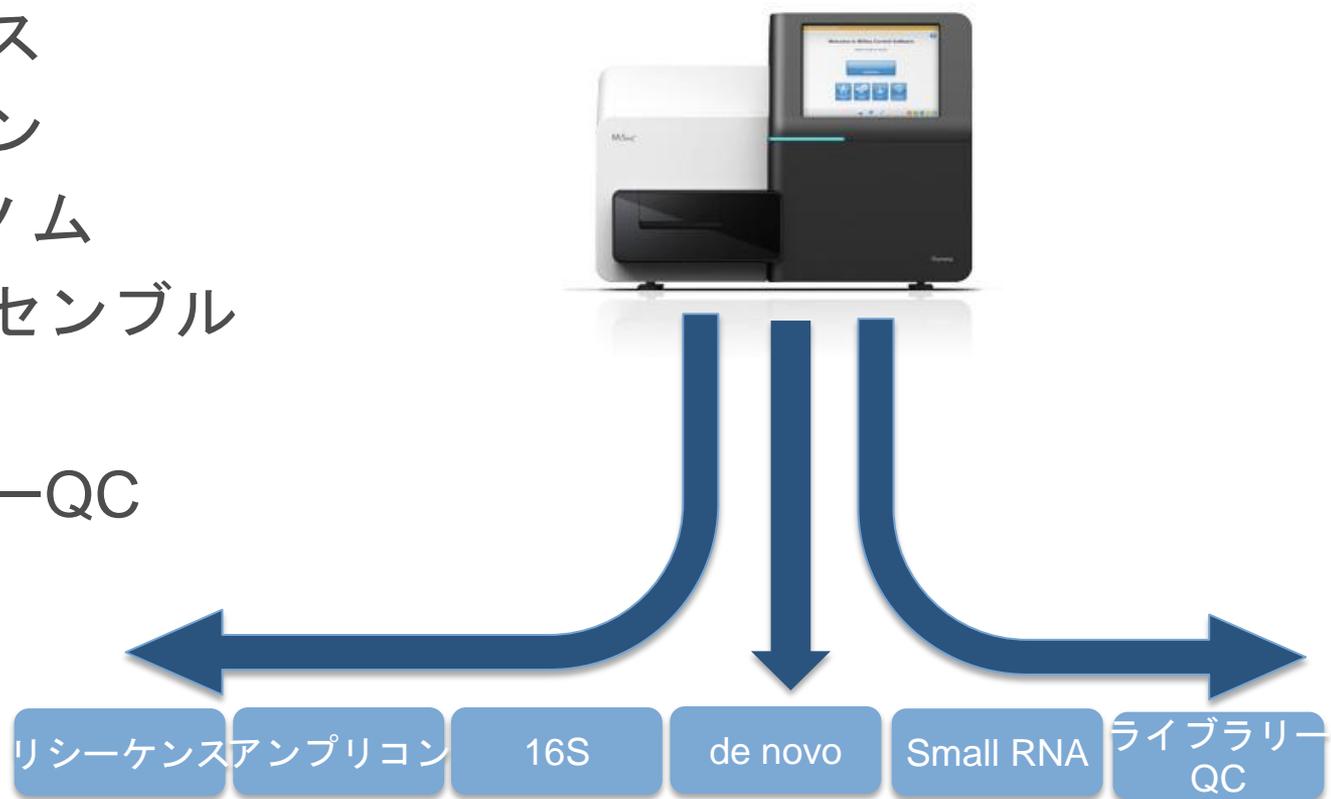
ユーザーが自分のWindowsPCにインストール/設定

MSR スタンドアロンとも呼称されます

- OSは64-bit Windows(Vista, Windows 7)
- 弊社webサイトMyIlluminaよりInstallation Guideをご参照ください

MiSeq Reporter 6つの基本ワークフロー

- リシーケンス
- アンプリコン
- 16Sメタゲノム
- De novo アセンブル
- Small RNA
- ライブラリー-QC



MiSeq Reporter 6つの基本ワークフロー

リシーケンス (Resequencing)

リファレンス配列(サンプルシートで指定)に対しアライメントし、変異解析を行いレポートします。

アンプリコン (Amplicon)

TSCA (TruSeq Custom Amplicon)
特定配列領域(マニフェストファイルで指定)に対しアライメントし、変異解析を行いレポートします。

ライブラリQC (Library QC)

クオリティーコントロール(QC)のためにライブラリの簡易アライメントし、サンプル毎の指標サマリを表示します。

Small RNA

miRNA, RNA, ゲノム配列等にアライメントし、結果やカウントを表示します。解析はSRに対してのみを行いレポートします。

De Novoアセンブリ

リードから小さいサイズのゲノム (<10 Mb) のアセンブリを行い、コンティグを作成することができます。

16S メタゲノミクス

微生物群集の分類学的多様性の特徴付けを行う際に広く使われている、16S rRNAを用いた分類を行いレポートします。

MiSeq Reporter 6つの基本ワークフロー

ドキュメント; 「MiSeq Reporter Quick Reference Guide」 もご参照下さい

ワークフローにつきましては、日本語版のtechnoteなども弊社ホームページよりダウンロード頂けますので、ぜひご利用下さい。

<http://www.illumina.com/systems/miseq/applications.ilmn>

リシーケンスアンプリコン

16S

de novo

Small RNA

ライブラリー
QC

MSR 全ワークフロー共通のポイント

リシーケンスアンプリコン

16S

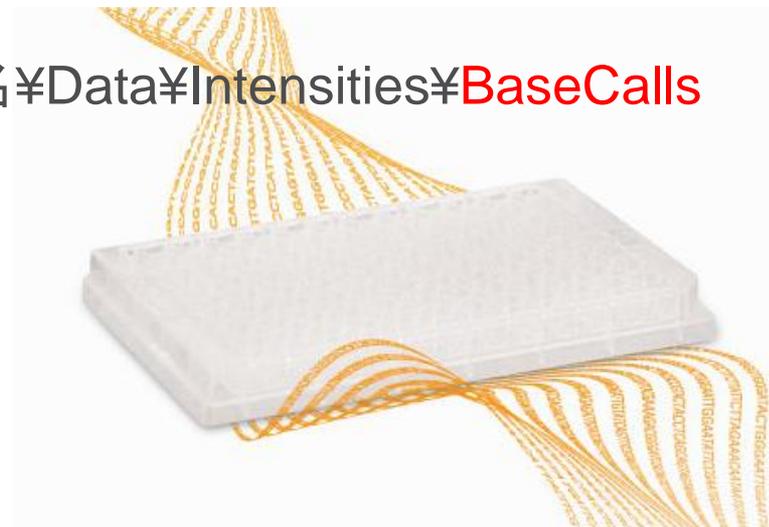
de novo

Small RNA

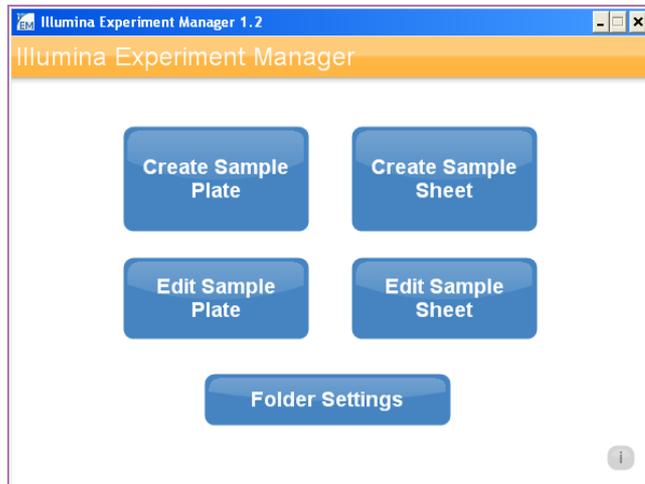
ライブラリー
QC

- ▶ サンプルシート（設定指示ファイル）作成が必要です。
- ▶ サンプルシートの内容に基づきデマルチプレックスが行われます。
- ▶ サンプルシートに記載されているワークフローが実施されます。
- ▶ 解析結果ファイルは、基本的に以下のフォルダ配下に生成されます。

D:\¥Illumina¥MiSeqAnalysis¥ランフォルダ名¥Data¥Intensities¥BaseCalls



サンプルシート (SampleSheet.csv)



- ▶ ランと解析の設定を行う要のファイル
- ▶ CSV形式（カンマ区切り）ファイル
- ▶ ワークフローにより、サンプルシートに記載する内容が異なります
- ▶ Illumina Experiment Manager (IEM) を用いて作成します

* サンプルシートはCSV形式のテキストですので、一般的なテキストエディタや表計算ソフト等でも作成できますが、記述ルールに起因するエラーのお問い合わせが頻出しておりますため、必ずIEMを使用して作成されることをお勧めいたします。

* 次回のテクニカルセミナーでIEMのご説明を予定しております。

Outline

- ▶ MiSeq Reporter (MSR) とは？
- ▶ Web インターフェイス
- ▶ OutputフォルダとFASTQ
- ▶ はじめのトラブルシュート

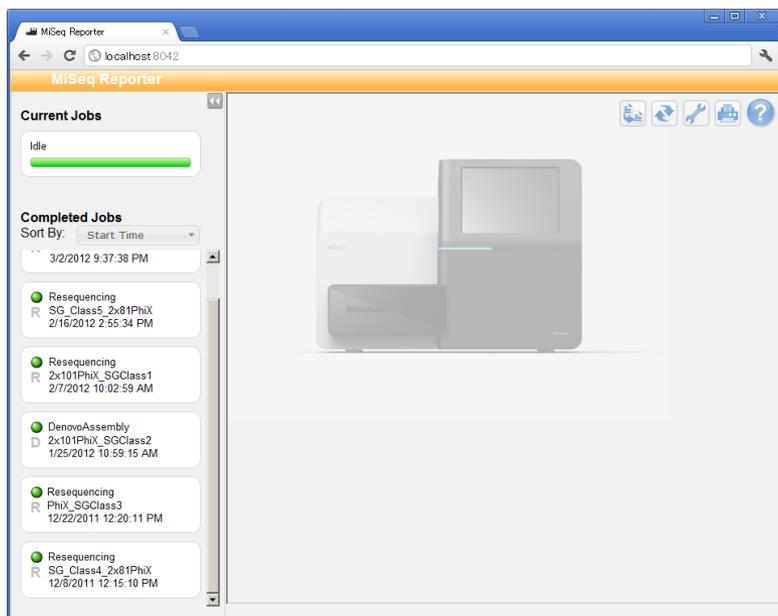


MiSeq Reporter



MiSeq Reporter Web インターフェイス

Webブラウザを起動し、アドレスを入力



<http://localhost:8042>

(MSRとWebブラウザを同じ機器で使用時)

<http://IPアドレス:8042>

(MSRとWebブラウザを別々の機器で使用時)

例;

<http://192.168.10.16:8042>

MSR トップ画面

メインウインドウ
左ペインで選択したランのステータス
とメトリクスが表示されるエリア

MSRの現在の解析稼働 状態

The screenshot displays the MiSeq Reporter web interface. The title bar reads "MiSeq Reporter". On the left, there is a sidebar with two sections: "Current Jobs" and "Completed Jobs".

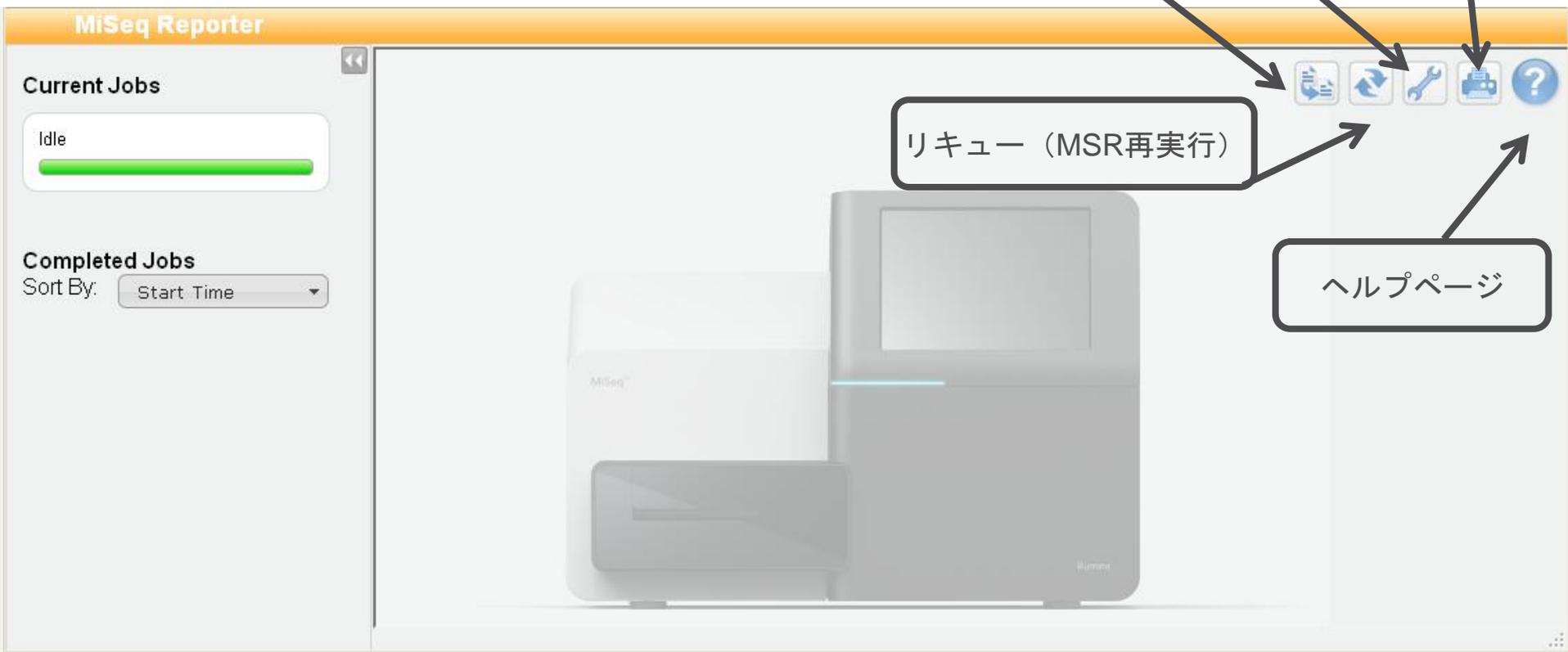
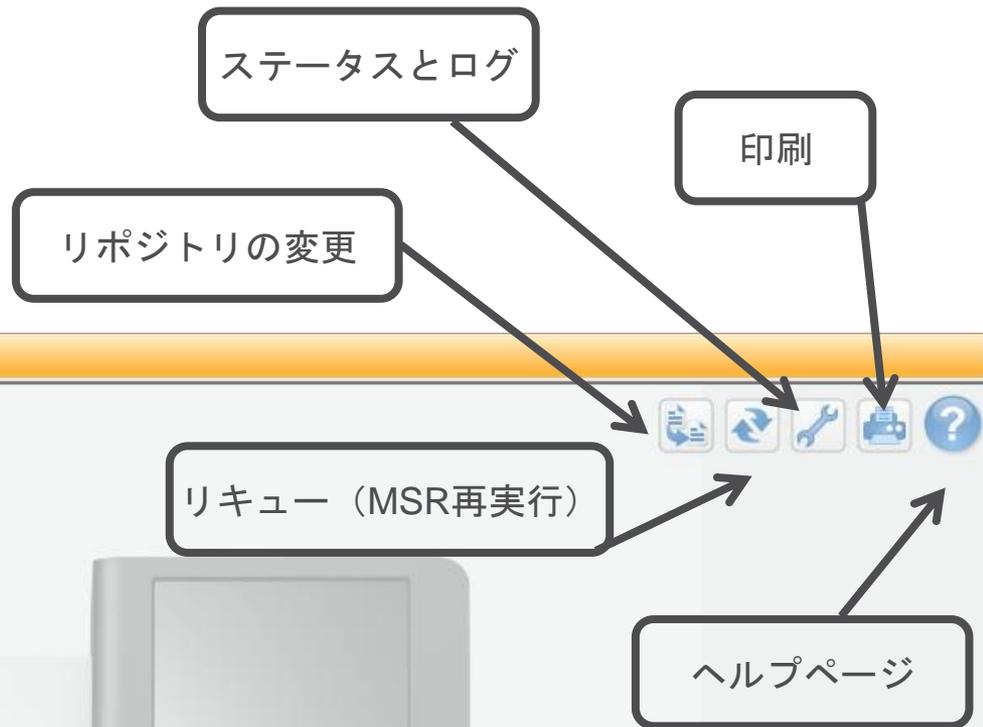
- Current Jobs:** Shows a single job with the status "Idle" and a green progress bar.
- Completed Jobs:** Includes a "Sort By:" dropdown menu set to "Start Time". Below it are four job entries:
 - DenovoAssembly (D) 2x151, 12/3/2011 5:13:21 PM
 - Resequencing (R) 2x151, 11/21/2011 6:04:21 PM
 - ▲ Resequencing (R) 1x151 Run, 2/7/2012 3:43:52 PM
 - SmallRNA (S) NGS182_Pool3, 11/23/2011 12:08:07 PM

The main content area on the right features a large, semi-transparent image of the MiSeq sequencer. A callout box with an arrow points to this image, indicating that the status and metrics of the selected run from the left sidebar are displayed here.

MSRの終了ステータス

過去のラン

MSR 操作ボタン



Resequencing/Ampliconワークフロー SUMMARYタブ



ヘルプページ

http://www.illumina.com/help/miseq_reporter/

Mozilla Firefox window showing the Illumina MiSeq Reporter homepage. The address bar displays www.illumina.com/help/miseq_reporter/default.htm. The page content includes a navigation menu on the left with links for Home, The Toolbar, Jobs, MiSeq Files, Technical Assistance, and Revision History. The main content area features a welcome message, a 'Welcome to Illumina MiSeq Reporter' heading, and an 'Introduction MiSeq Concepts' section with 'BACK' and 'FORWARD' buttons. A footer contains copyright information for 2011 Illumina, Inc. and a contact link.

Summary Information page in the Illumina MiSeq Reporter. The page title is 'Summary Information'. It contains a table of job information and a 'High Percentage' graph section.

Row	Description
Analysis Folder	The full path to the analysis output folder on-instrument
Completion Time	The time the experiment was completed
Copy Folder	The full path to the network folder to which analysis output is copied
Cycles	A string describing the number of cycles in each read and whether the read is an index read. For example, 151 [N] 8[Y] 151[N] indicates a first read of 151 cycles that is not an index read, a second read of 8 cycles that is not an index read, and a third read of 151 cycles that is not an index read.
Experiment Name	A user-supplied descriptive name of the experiment.
Investigator	The name of the investigator (optional).
Project	An optional user-supplied descriptive name of the project.
Run Folder	The output folder produced by RTA primary analysis software. This folder contains all primary and secondary analysis results for the run.
Start Time	The clock time that the secondary analysis was started.

High Percentage Graph Information

y-axis	x-axis	Description
Percent	20/ 1 1	The ratio of intensities at Cycle 20 to the intensities at Cycle 1 for Read 1
	20/ 1 2	The ratio of intensities at Cycle 20 to the intensities at Cycle 1 for Read 2
Align 1		The percentage of clusters that aligned to the reference genome in Read 1. This field is not available for Assembly, Metagenomics, and SmallRNA workflows.
Align 2		The percentage of clusters that aligned to the reference in Read 2. This field is not available for Assembly, Metagenomics, and SmallRNA workflows.
PE Orientation		The percentage of paired-end alignments that have the expected orientation
PE Resynthesis		The ratio of first cycle intensities for Read 1 to first cycle intensities for Read 2
PF		The percentage of clusters passing filters

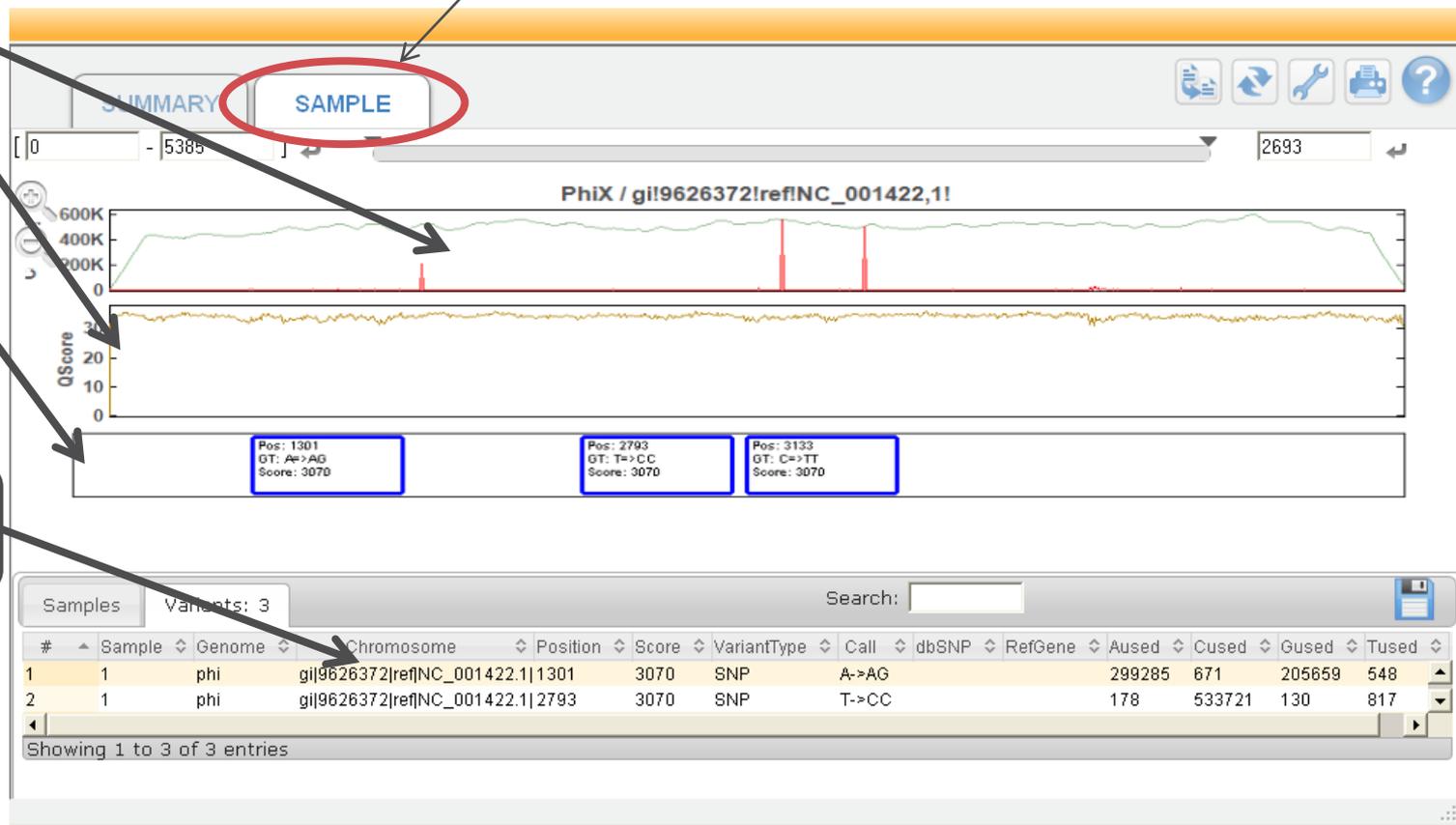
Resequencing/Ampliconワークフロー SAMPLE タブ 表示事項

カバレッジとエラー

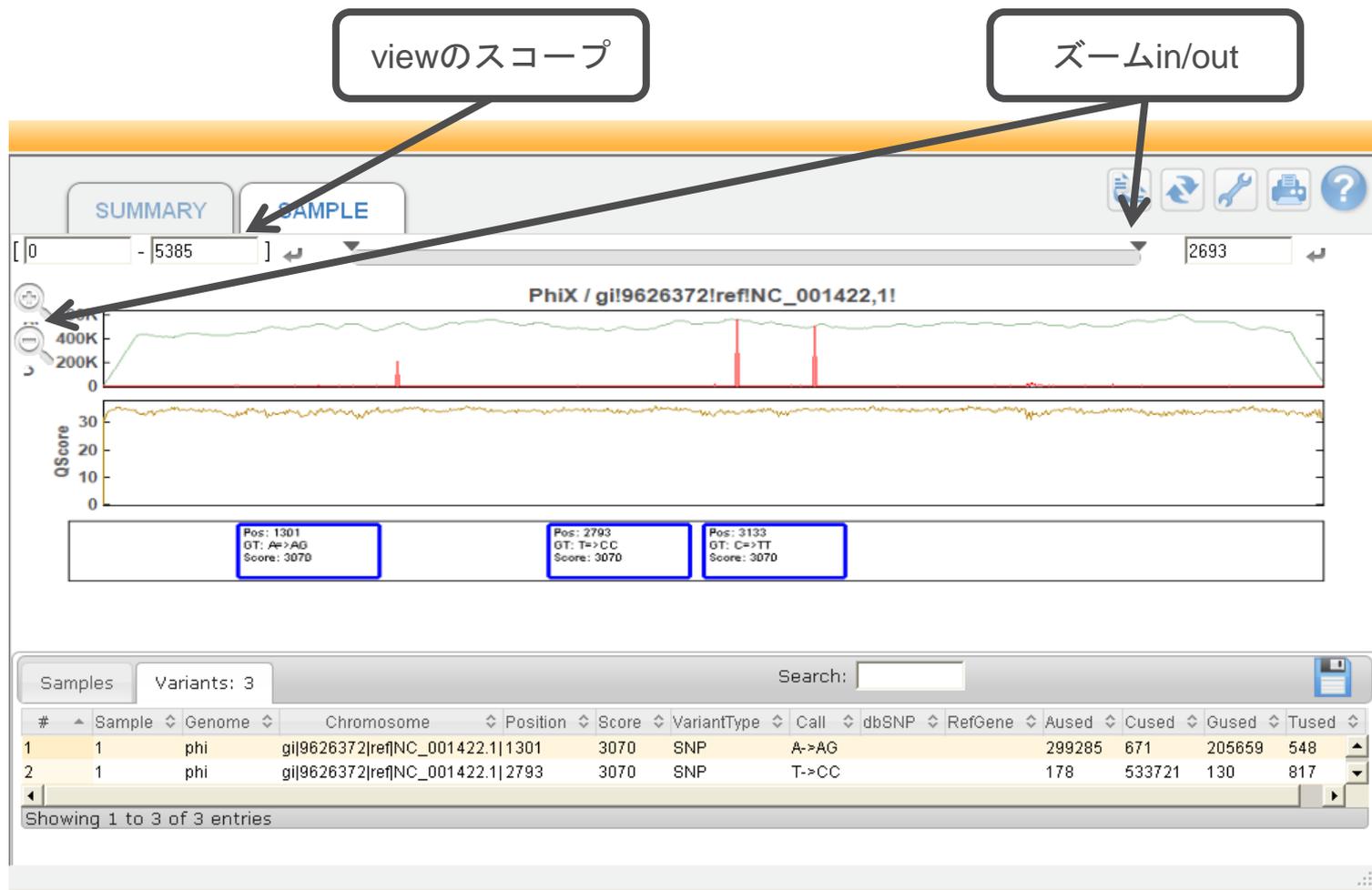
Q score

SNP/indel +
アノテーション

サンプル/
変異テーブル



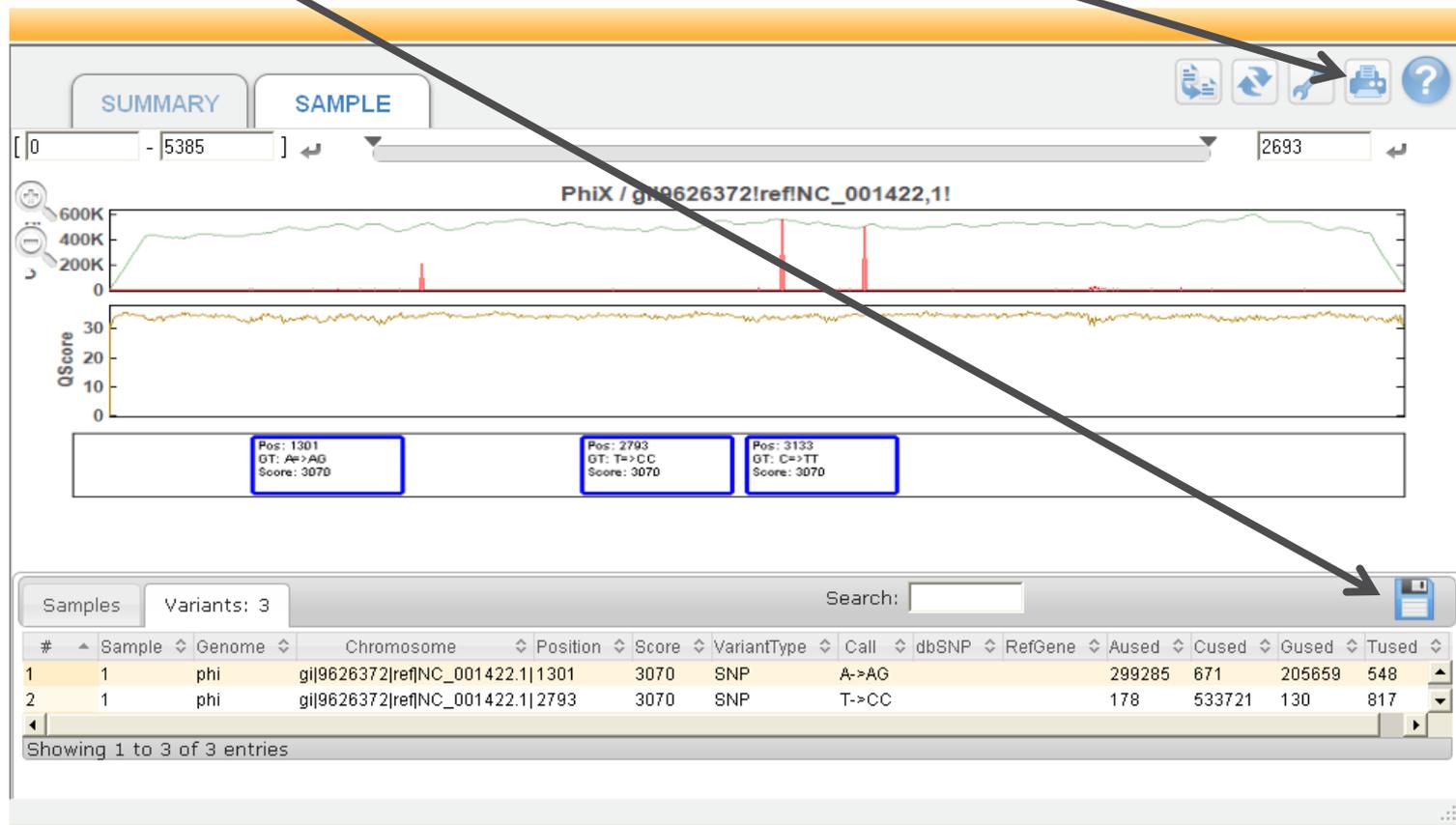
Resquencing/Ampliconワークフロー SAMPLE タブ Viewの操作



General データのエクスポート

テーブル情報のエクスポート
(csv 形式)

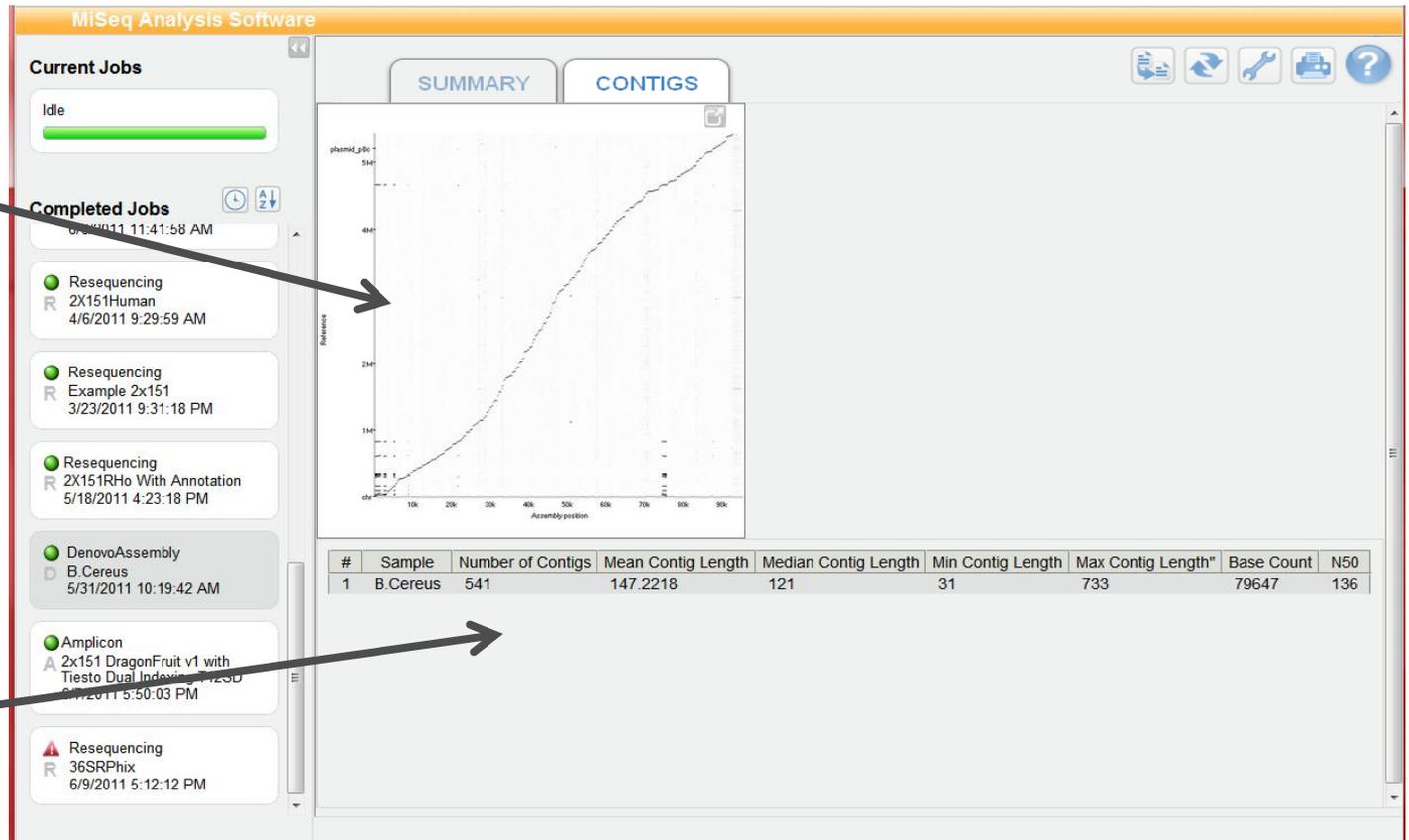
印刷ボタン



De Novo アセンブリ ワークフロー CONTIGSタブ

ドットプロット

メトリクス



- * Dot plot は、サンプルシートでリファレンス配列を指定した場合にのみ表示されます
- * De Novoアセンブリワークフローではリファレンスゲノムは必須ではありません。

Small RNAワークフロー SUMMARY タブ

アライン結果の内訳

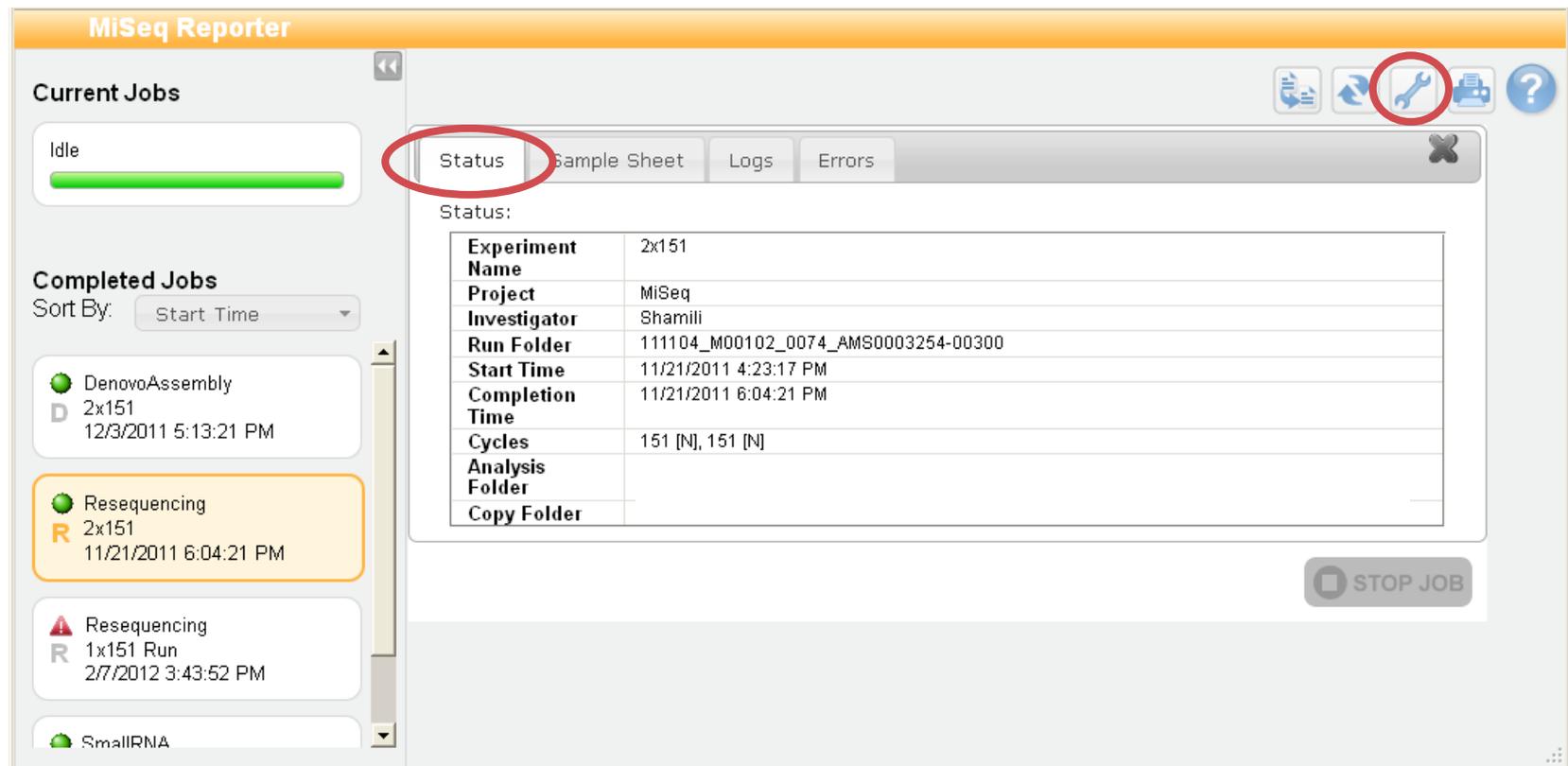
miRNA トップ10

サンプルテーブル

#	Sample	Clus.Raw	Clus.PF	Clus.Align.Contam	Clus.Align.MiRNA	Clus.Align.RNA	Clus.Align.Genome	Clus.Unaligned
0	Unindexed	547756	89297	4067	28327	397	16737	39769
1	HuBr	1679252	1363645	211089	744942	20622	193750	193242
2	HuBr	1921487	1536938	231388	825037	23395	208309	248809
3	HuKi	1840655	1484823	66632	1231127	11189	92287	83588
4	HuLu	1456681	1148141	92367	833210	15467	84497	122600

General Run Status タブ

- ▶ ランの解析について Status の情報が得られる

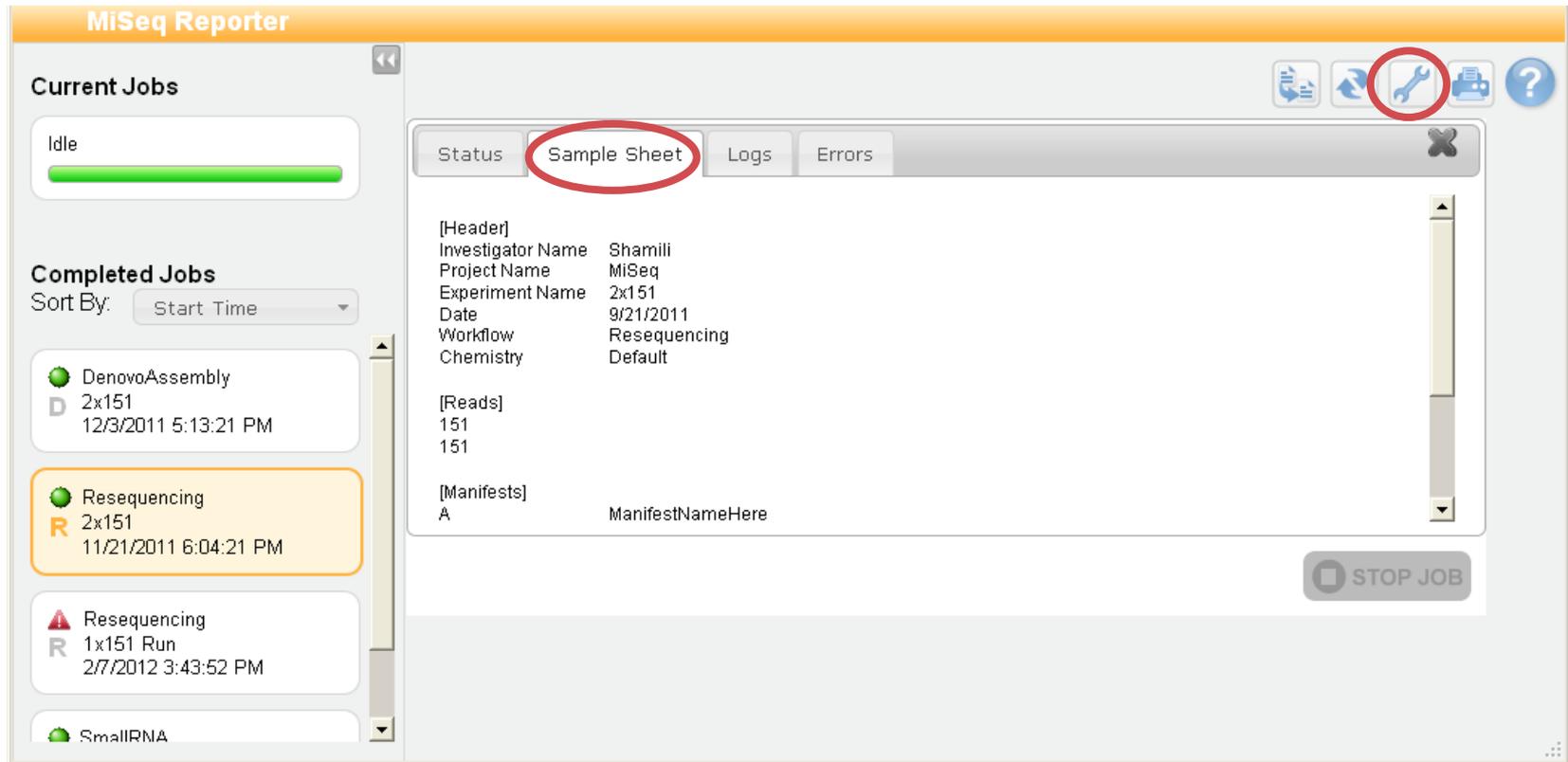


The screenshot displays the MiSeq Reporter interface. On the left, there are sections for 'Current Jobs' (showing an 'Idle' job) and 'Completed Jobs' (listing 'DenovoAssembly', 'Resequencing', 'Resequencing', and 'SmallRNA'). The main area shows a 'Status' tab selected, which is circled in red. This tab displays a table of job details. A 'STOP JOB' button is visible at the bottom right of the status window. In the top right corner of the main interface, a wrench icon is also circled in red.

Status:	
Experiment Name	2x151
Project	MISeq
Investigator	Shamili
Run Folder	111104_M00102_0074_AMS0003254-00300
Start Time	11/21/2011 4:23:17 PM
Completion Time	11/21/2011 6:04:21 PM
Cycles	151 [N], 151 [N]
Analysis Folder	
Copy Folder	

General Run Sample Sheet タブ

- ▶ ランの解析について Status; Sample Sheet などの情報が得られる



The screenshot displays the MiSeq Reporter software interface. On the left, there are sections for 'Current Jobs' (showing an 'Idle' job) and 'Completed Jobs' (listing 'DenovoAssembly', 'Resequencing', and 'SmallRNA'). The main area shows a 'Sample Sheet' tab selected, displaying job details:

[Header]	
Investigator Name	Shamili
Project Name	MISeq
Experiment Name	2x151
Date	9/21/2011
Workflow	Resequencing
Chemistry	Default

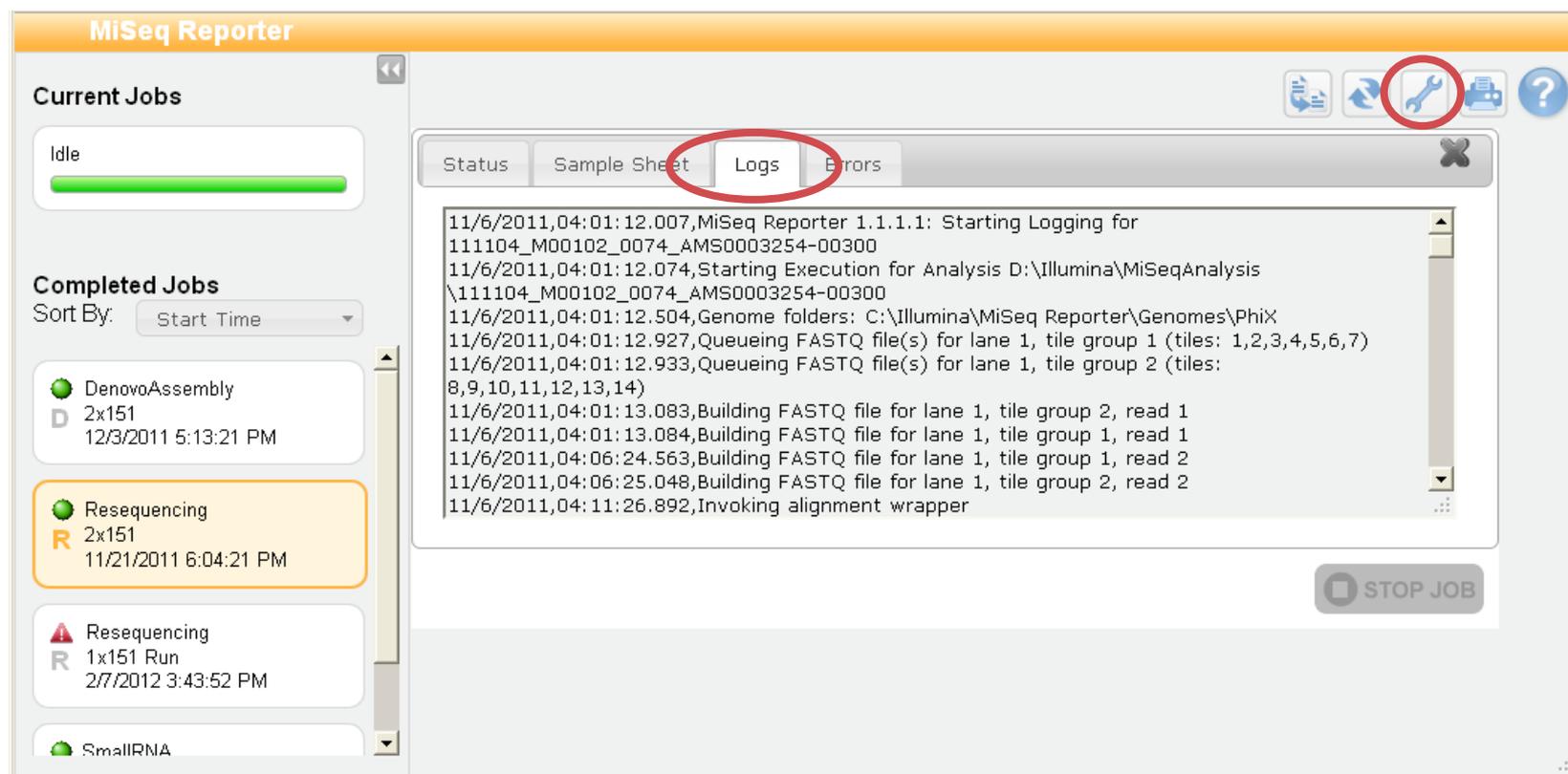
[Reads]	
151	
151	

[Manifests]	
A	ManifestNameHere

At the bottom right of the main area, there is a 'STOP JOB' button. A red circle highlights the 'Sample Sheet' tab and the settings icon in the top right corner of the interface.

General Run Logs タブ

- ▶ ランの解析について Status; Sample Sheet; Logs などの情報が得られる

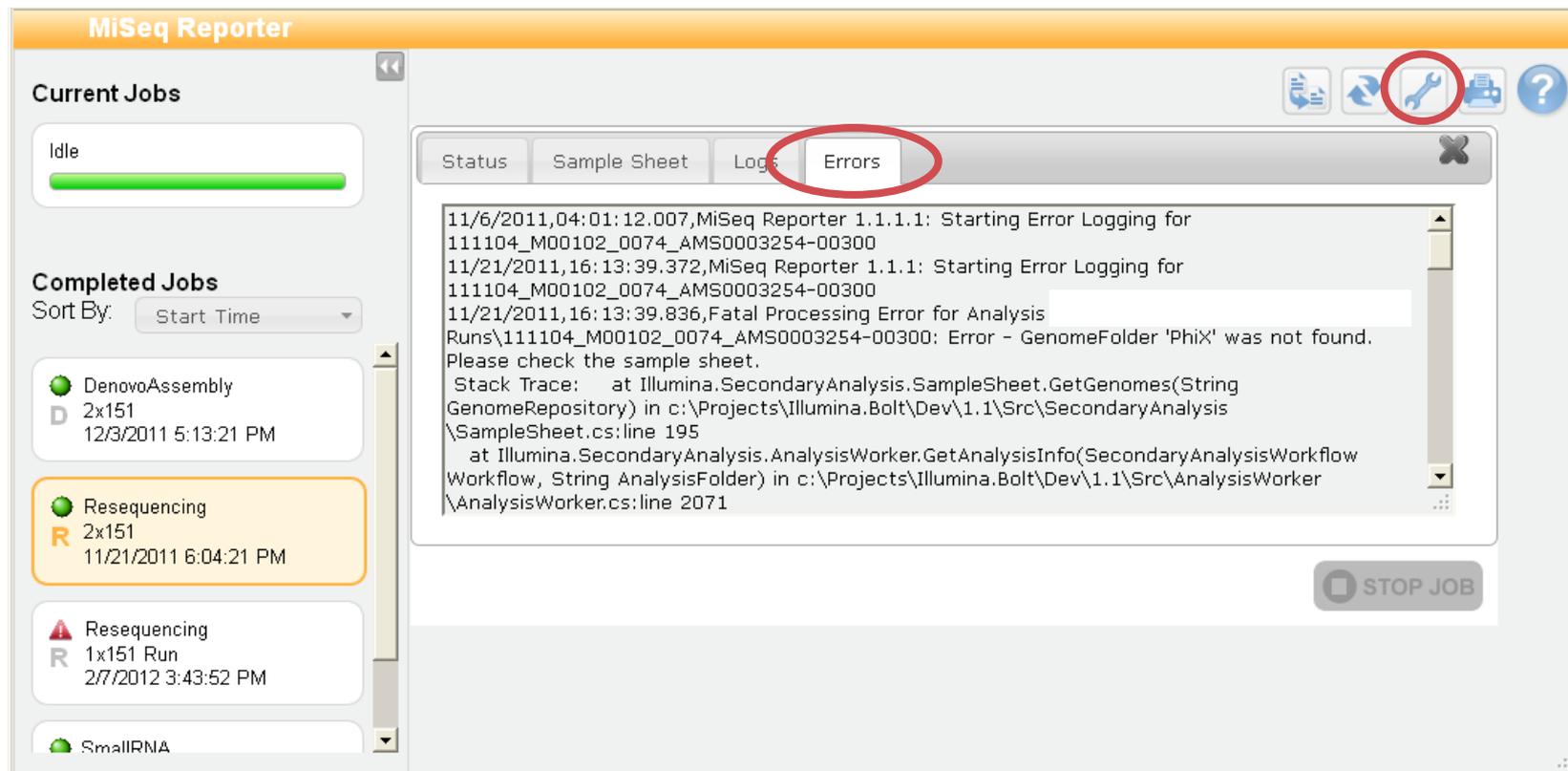


The screenshot displays the MiSeq Reporter software interface. On the left, there are sections for 'Current Jobs' (showing an 'Idle' job with a green progress bar) and 'Completed Jobs' (listing jobs like 'DenovoAssembly', 'Resequencing', and 'SmallRNA'). The main area shows a job window with tabs for 'Status', 'Sample Sheet', 'Logs', and 'Errors'. The 'Logs' tab is selected and circled in red. The log text shows the start of a run, including file paths and timestamps. A 'STOP JOB' button is visible at the bottom right of the job window.

```
11/6/2011,04:01:12.007,MiSeq Reporter 1.1.1.1: Starting Logging for
111104_M00102_0074_AMS0003254-00300
11/6/2011,04:01:12.074,Starting Execution for Analysis D:\Illumina\MiSeqAnalysis
\111104_M00102_0074_AMS0003254-00300
11/6/2011,04:01:12.504,Genome folders: C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes\PhiX
11/6/2011,04:01:12.927,Queueing FASTQ file(s) for lane 1, tile group 1 (tiles: 1,2,3,4,5,6,7)
11/6/2011,04:01:12.933,Queueing FASTQ file(s) for lane 1, tile group 2 (tiles:
8,9,10,11,12,13,14)
11/6/2011,04:01:13.083,Building FASTQ file for lane 1, tile group 2, read 1
11/6/2011,04:01:13.084,Building FASTQ file for lane 1, tile group 1, read 1
11/6/2011,04:06:24.563,Building FASTQ file for lane 1, tile group 1, read 2
11/6/2011,04:06:25.048,Building FASTQ file for lane 1, tile group 2, read 2
11/6/2011,04:11:26.892,Invoking alignment wrapper
```

General Run Errors タブ

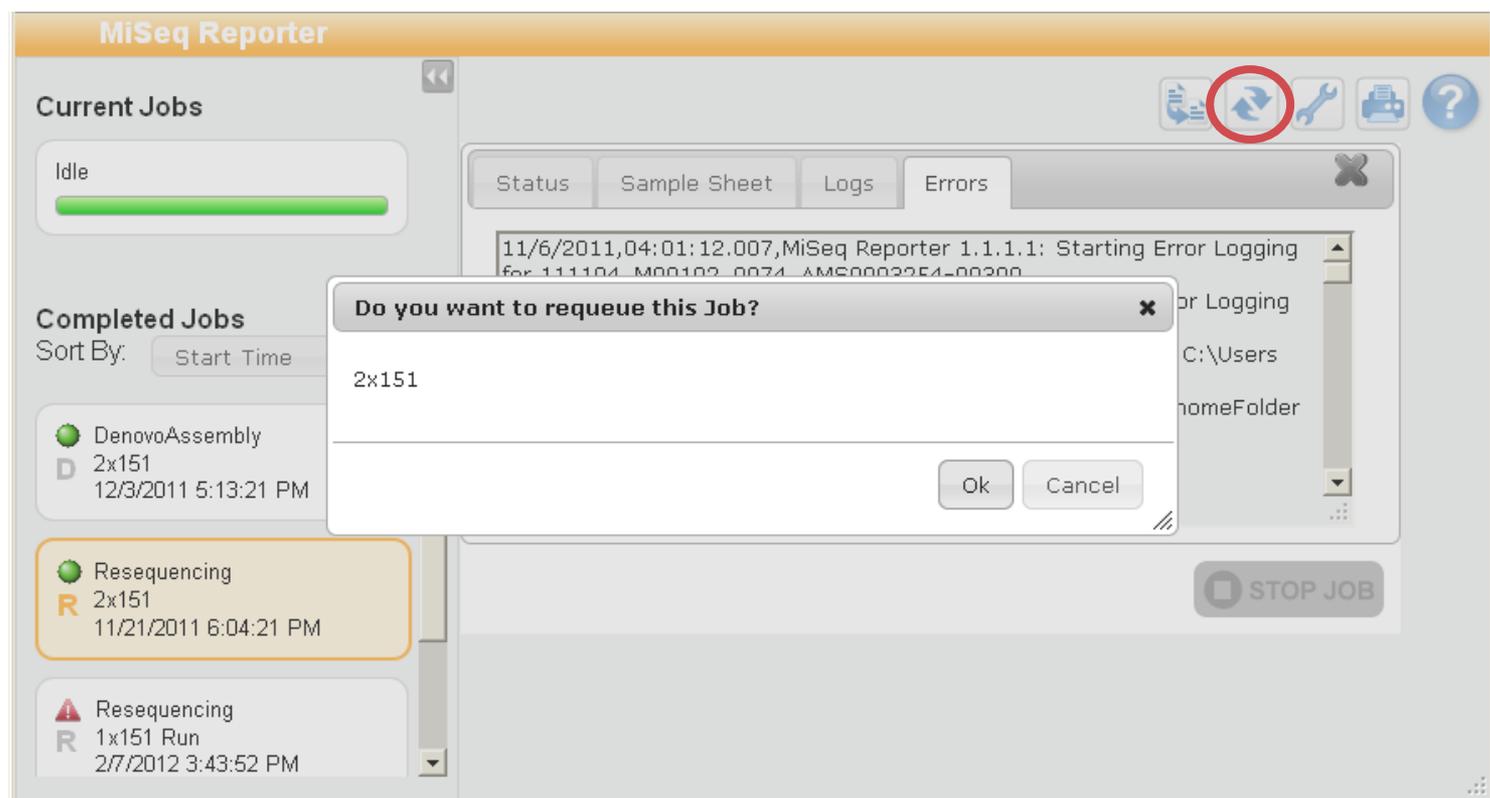
- ▶ ランの解析について Status; Sample Sheet; Logs ; Errorsなどの情報が得られる



The screenshot displays the MiSeq Reporter software interface. On the left, there are sections for 'Current Jobs' (showing an 'Idle' status) and 'Completed Jobs' (listing various runs like DenovoAssembly, Resequencing, and SmallRNA). The main area on the right features a tabbed interface with 'Status', 'Sample Sheet', 'Logs', and 'Errors' tabs. The 'Errors' tab is highlighted with a red circle. Above the tabs, a toolbar contains several icons, with a wrench icon also circled in red. The 'Errors' tab displays a log entry for a fatal processing error: 'Fatal Processing Error for Analysis Runs\111104_M00102_0074_AMS0003254-00300: Error - GenomeFolder 'PhiX' was not found. Please check the sample sheet.' Below the log text is a 'STOP JOB' button.

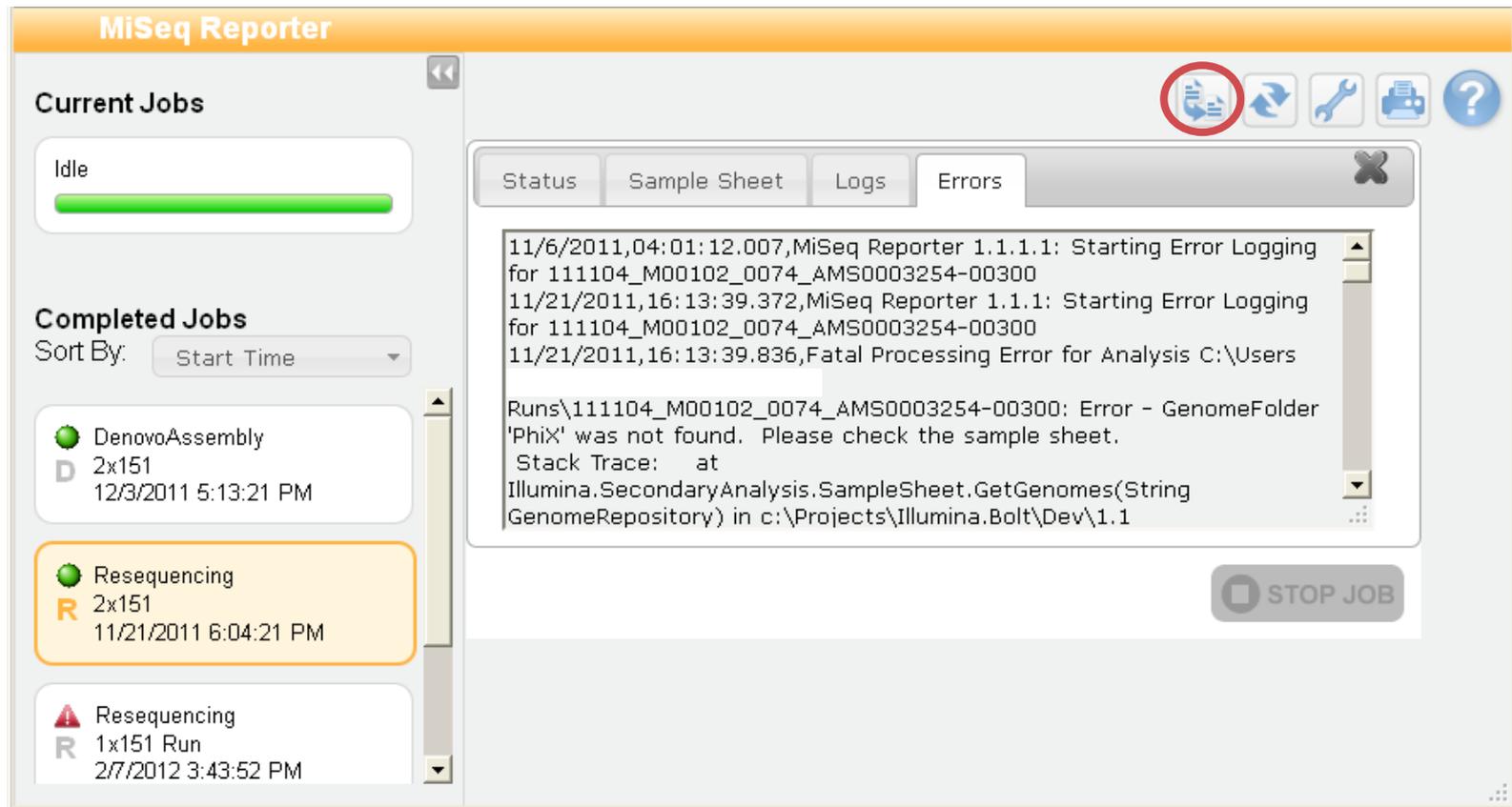
MSR 再実行（リキュー）

- ▶ MSRでランデータのプロセスを再実行したい場合にリキューボタンを押します
- ▶ サンプルシートで与えるパラメータを変更して再実行させることが可能です。



MSR リポジトリの変更

- ▶ MiSeq上では、通常はこのボタンからパスを変更する必要はありません
- ▶ リポジトリとは、解析/表示したいランフォルダのある場所（パス）です（通常はMiSeqAnalysisフォルダ）



The screenshot displays the MiSeq Reporter software interface. On the left, there are sections for 'Current Jobs' (showing an 'Idle' job) and 'Completed Jobs' (listing 'DenovoAssembly', 'Resequencing', and another 'Resequencing' job). The main area on the right shows a 'Status' window with tabs for 'Status', 'Sample Sheet', 'Logs', and 'Errors'. The 'Errors' tab is active, displaying a log entry: '11/21/2011,16:13:39.836,Fatal Processing Error for Analysis C:\Users\Runs\111104_M00102_0074_AMS0003254-00300: Error - GenomeFolder 'PhiX' was not found. Please check the sample sheet. Stack Trace: at Illumina.SecondaryAnalysis.SampleSheet.GetGenomes(String GenomeRepository) in c:\Projects\Illumina.Bolt\Dev\1.1'. A 'STOP JOB' button is visible at the bottom right of the error log window. A red circle highlights a button in the top right corner of the interface, which is the 'Change Path' button.

Outline

- ▶ MiSeq Reporter (MSR) とは？
- ▶ Web インターフェイス
- ▶ OutputフォルダとFASTQ
- ▶ はじめのトラブルシュート

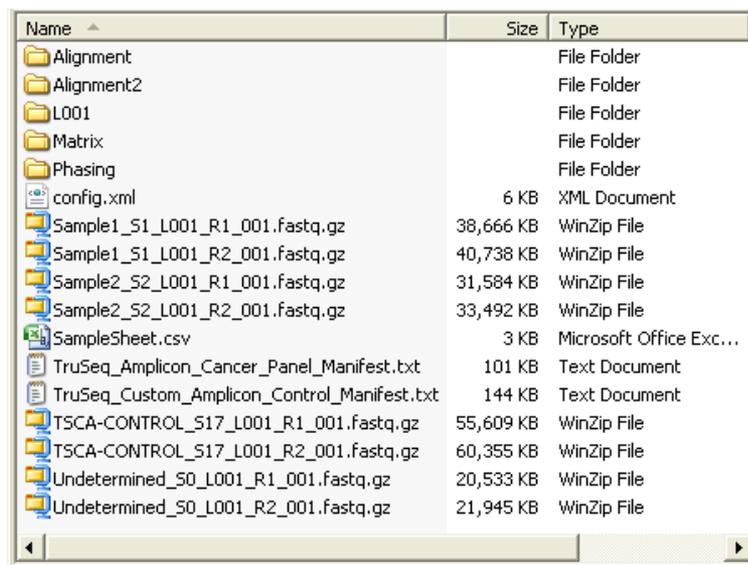


MiSeq Reporter



MSRの結果ファイル

- ▶ D:\¥Illumina¥MiSeqAnalysis¥当該ランフォルダ名¥Data¥Intensities¥BaseCalls



Name	Size	Type
Alignment		File Folder
Alignment2		File Folder
L001		File Folder
Matrix		File Folder
Phasing		File Folder
config.xml	6 KB	XML Document
Sample1_S1_L001_R1_001.fastq.gz	38,666 KB	WinZip File
Sample1_S1_L001_R2_001.fastq.gz	40,738 KB	WinZip File
Sample2_S2_L001_R1_001.fastq.gz	31,584 KB	WinZip File
Sample2_S2_L001_R2_001.fastq.gz	33,492 KB	WinZip File
SampleSheet.csv	3 KB	Microsoft Office Exc...
TruSeq_Amplicon_Cancer_Panel_Manifest.txt	101 KB	Text Document
TruSeq_Custom_Amplicon_Control_Manifest.txt	144 KB	Text Document
TSCA-CONTROL_S17_L001_R1_001.fastq.gz	55,609 KB	WinZip File
TSCA-CONTROL_S17_L001_R2_001.fastq.gz	60,355 KB	WinZip File
Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz	20,533 KB	WinZip File
Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz	21,945 KB	WinZip File

* MSR v1.3

- ▶ アライメント以降の結果は、AlignmentNディレクトリの中に生成されます。
- ▶ 既存のAlignmentNディレクトリはリキューしても上書きされません。
リキュー結果はAlignmentフォルダの数字がインクリメントされたフォルダに生成され、過去のAlignmentディレクトリは保存されます。
- ▶ フォルダやファイルの更新時間情報もご確認に役立ちます。

FASTQファイルの命名規則

* v1.3

例; `MySampleA_S1_L001_R1_001.fastq.gz`

- ▶ ファイルの命名規則は以下の通りです。
- ▶ `a_Sb_Lc_Rd_001.fastq.gz` とした場合;
 - a ... **サンプル名**
(サンプルシートで指定したサンプル名)
 - Sb ... **サンプル番号**
(サンプルシートで指定したサンプルを行の上から1,2,3..とふって行った番号。0はどのサンプルにも帰属できなかったもの)
 - Lb ... **レーン番号**
(MiSeqでは現在1レーンのみのため、必ずL001になります)
 - Rc ... **リード番号**
(リード1はR1, リード2はR2になります)

* v1.1.6ではサンプル毎ではなく、タイルグループ毎のFASTQとなり命名規則も異なりましたので、ご注意ください。

Outline

- ▶ MiSeq Reporter (MSR) とは？
- ▶ Web インターフェイス
- ▶ OutputフォルダとFASTQ
- ▶ はじめのトラブルシューティング



MiSeq Reporter



まずは、Help !

The screenshot shows a Mozilla Firefox browser window with the address bar displaying www.illumina.com/help/miseq_reporter/default.htm. The page content includes a navigation menu on the left with items: Home, The Toolbar, Jobs, MiSeq Files, Technical Assistance, and Revision History. Below this menu are sections for Table of Contents, Search, and Favorites. The main content area features the heading "Welcome to Illumina MiSeq Reporter" in orange, followed by "Introduction" and "MiSeq Concepts" in blue. There are "BACK" and "FORWARD" navigation buttons. At the bottom, it states "© 2011 Illumina, Inc. All rights reserved" and provides the contact URL www.illumina.com/contact. The Illumina logo is visible in the bottom right corner of the page.

**Q : MSRで解析結果
がでてきません**

Errorは出ていますでしょうか？

- ▶ MSR左ペインのランのiconは、緑の○？赤の△？
- ▶ MSRのErrorタブに、開始と終了のログステートメントがありますか？
- ▶ MSRのErrorログにステートがあった場合は、その内容を読み、修正後、再度リキューして下さい。
- ▶ MSRのErrorログになにもなくLogsタブにも開始した痕跡がない。

次へ...

RTAによる一次解析は終了していますか？

MSRが解析に必要とする特に以下のファイルはランフォルダの直下にそろっていますか？

- RTAComplete.txt
- SampleSheet.csv
- RunInfo.xml

バックグラウンドでまだRTAが働いていて、MSRが解析を待機している状態があり得ます。RTAComplete.txt というRTA終了フラグファイルが生成されておらず、稼働中でしたら慌てずにそのままお待ちください。

- ▶ 終了している。ファイルもある。 次へ....

SampleSheet はOKですか？

- ▶ SampleSheetはIEMで作成したものでですか？
- ▶ SampleSheetはカンマ区切りの間の値が二重カッコで囲まれていませんか？

=> Excelなど表計算ソフトでは見えない場合がありますので、notepadなどテキストエディタでご確認下さい。

- ▶ Illegal Charactersは使われていませんか？

? () [] / ¥ = + < > : ; " ' , * ^ | & .

リファレンス配列はどうでしょう？

- ▶ SampleSheetで指定したリファレンスゲノムのフォルダの下に.fastaあるいは.faという拡張子をもつFASTAファイルがありますか？
- ▶ SampleSheetで指定したリファレンスゲノムのFASTAファイルのコメント部に以下のIllegal Charactersが含まれていませんか？

? () [] / ¥ = + < > : ; " ' , * ^ | & .

表示させているリポジトリはありますか？

(特に、MSRスタンドアロンをお使いの場合)

- ▶ MSRの左ペインには、ランを示す四角いラベルが見えていますか？
- ▶ いくつか前のランもあるはずの場合、それらのランも左ペインに表示されていますか？
- ▶ 違った場所をみている場合は、MSRのリポジトリボタンを押し、どこの場所をリポジトリとしているかご確認下さい。

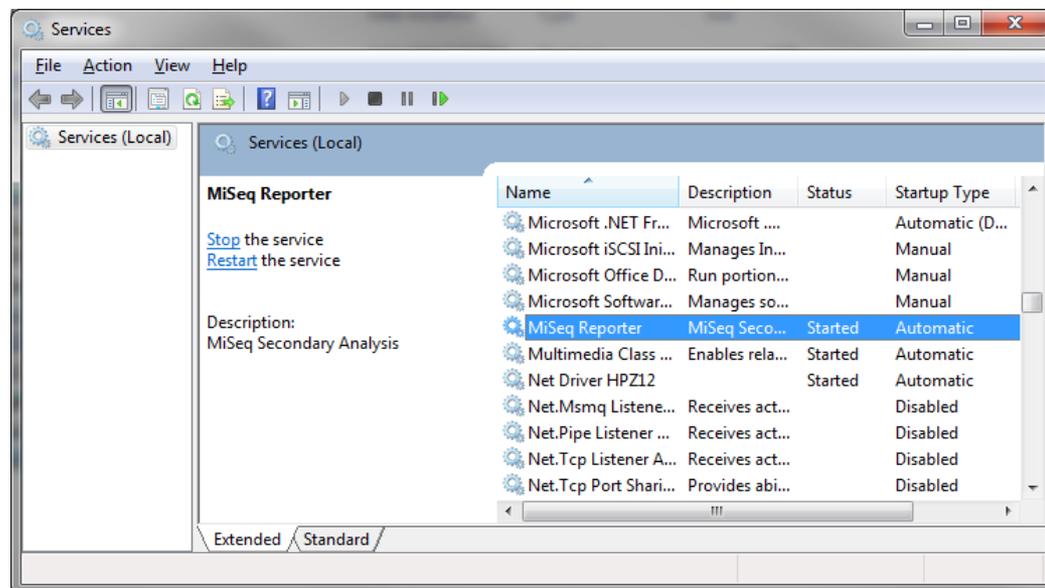
MSRはサービスしていますか？

MiSeq Reporterがサービスをしているか調べる



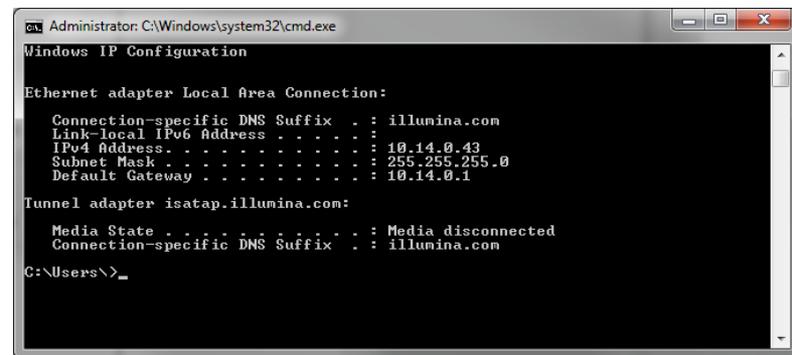
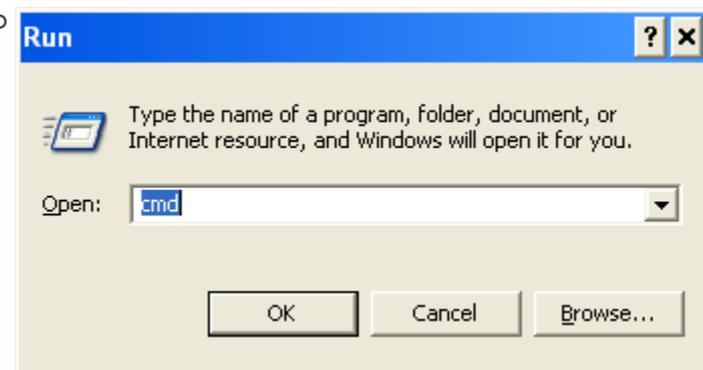
Start button -> Control Panels -> Administrative Tools -> Services

- ▶ MiSeqReporter サービスをハイライトさせStatus列の表示を確認します。
- ▶ 右クリックで、起動、停止、再起動が選べますので、止まっていた場合は、起動して下さい。



Appendix: IPアドレスの確認方法

- ▶ Windows Startボタンを押し、Rを押すことでRun windowのフィールドへ移動します。
- ▶ cmdというコマンドを打ち込みOKを押します。
- ▶ ipconfigコマンドを打ち込みEnterキーを
- ▶ “IP v4”の箇所にIPが表示されます





techsupport@illumina.com