

NGSをはじめよう！これだけは知っておきたいMiSeq ～ 解析原理と必要な試薬キット、装置の使い方～

June 27, 2014



米田 瑞穂
イリミナ株式会社
テクニカルアプリケーション サイエнтиスト

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.
Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIX, 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®

本日のOutline

- ▶ MiSeqの概要
- ▶ MiSeqのワークフロー
 - ・必要な試薬類
 - ・解析原理
- ▶ データ解析
MiSeq Reporter



MiSeqとは？

1 ng~1 μ gのDNA(RNA)サンプルから調製したライブラリー



イルミナ社のデスクトップ型の
次世代シーケンサー(NGS)

相補鎖DNAを合成しながら読み取りを
行うSequencing By Synthesis (SBS法)を
用いる



最大15 Gbasesの塩基が解析可能！ 2013年6月時点

MiSeqで対応可能なアプリケーション



HiSeq2500
1000 Gb / ラン
6日 / ラン



NextSeq 500
120 Gb / ラン
1日 / ラン

全ゲノム解析
エクソン解析

トランスクリプトーム解析
遺伝子発現プロファイル解析
メチル化解析
メタゲノム解析
微生物ゲノム解析
ターゲットリシーケンシング
ChIP-Seq解析
Small RNA解析

多サンプルアンプリコンシーケンス
アンプリコンシーケンス
ライブラリQC

MiSeq **v2試薬**
~8 Gb / ラン
~2日 (39時間) / ラン

MiSeq **v3試薬**
~15 Gb / ラン
~3日 (55時間) / ラン



MiSeqランのワークフロー

1.

ライブラリーの調製



2.

Illumina Experiment Manager (IEM)を用いた
サンプルシートの作成



3.

クラスター形成、MiSeqによるシーケンシング



4.

MiSeq Reporterによるデータ解析

MiSeqのランに必要なもの



② サンプルシート



③ フローセル



④ MiSeq試薬キット

① 調製したライブラリー

MiSeq Control Software (MCS)



- 画像案内でランセットアップをサポート
- MiSeqのラン実施までは、タッチパネルを数回操作するだけ
- 試薬セットの際に動画での手順説明を閲覧可能
- ラン中にデータ品質、クラスター数などのパラメーターをディスプレイに表示

MiSeqランのワークフロー

1.

ライブラリーの調製



2.

Illumina Experiment Manager (IEM)を用いた
サンプルシートの作成



3.

クラスター形成、MiSeqによるシーケンシング



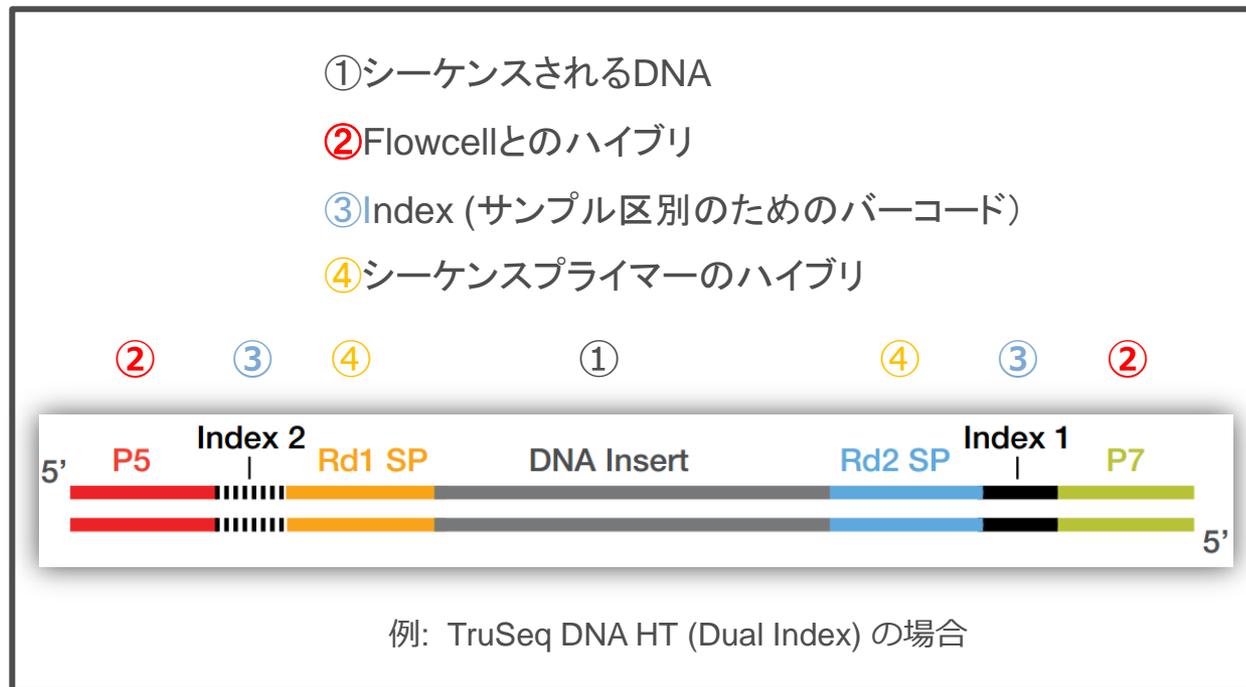
4.

MiSeq Reporterによるデータ解析

ライブラリーの調製

- ▶ ライブラリー調製: アダプターが両端に付いた核酸断片を得る
- ▶ イルミナのライブラリー調製キット

- ▶ 推奨定量方法
 - qPCR
- ▶ 推奨定性方法
 - Bioanalyzer
 - ゲル電気泳動



正確なライブラリ品質の確認と定量が、最適なクラスタ密度と高いシーケンスパフォーマンスを得るためには必要不可欠である。

ライブラリーの品質確認について

サポートウェビナーシリーズ2013

「Bioanalyzerを使用したLibrary QCトラブルシューティング」 2013/10/18

BioAnalyzerを使用したLibrary QC と トラブルシューティング

田中 敦成
illumina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, DNAS, DesignStudio, Eco, GATK, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, ViewCode, the jumpkin 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.

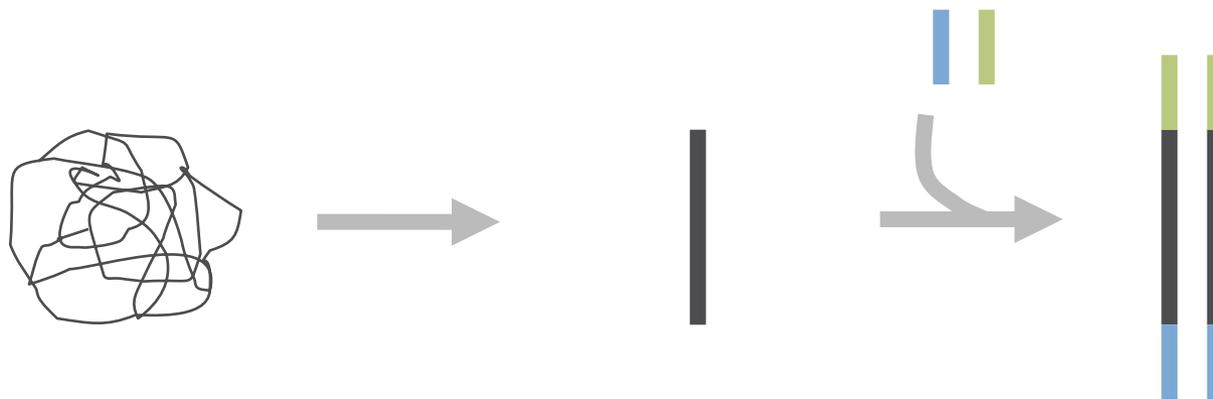
illumina®

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

ライブラリーの調製

DNAライブラリーの調製方法例 (TruSeq DNA prepの場合)

- ▶ アプリケーションごとに最適化された試薬キットの提供



ゲノムDNA (1 ugから)

DNAの断片化
数百bp

2種類のアダプター付加
→DNAライブラリー

主なライブラリー調製キット(2014年6月現在)



TruSeq Nano DNA

TruSeq DNA
PCR-Free

Nextera DNA

Nextera XT

Nextera Mate Pair

TruSeq Custom
Amplicon

TruSeq Custom
Amplicon Cancer Panel

Nextera Rapid
Capture Exome

Nextera Rapid Capture
Custom Enrichment

TruSight Tumor

TruSight Myeloid

TruSight
疾患パネル

TruSeq ChIP

TruSeq RNA

TruSeq Stranded
mRNA

TruSeq Stranded
Total RNA

TruSeq Small RNA

TruSeq RNA
Access Library Kit

TruSeq targeted
RNA Panel



シーケンスサンプル調製キット “Kit Selector”

「あなたのアプリケーションに適したサンプル調製キットを探す」 2014/03/31

クリックして
選びながら
進みます

The screenshot shows the Illumina website's 'Kit Selector' tool. At the top, there is a navigation bar with 'illumina' logo, a search bar, and links for 'お問い合わせ', 'MyIllumina', and 'Tools'. Below this is a secondary navigation bar with categories: 'アプリケーション', 'システム', '臨床研究', '受託サービス', 'サイエンス', 'サポート', and 'カンパニー'. The 'サポート' (Support) category is selected, and the page title is 'サポート » シーケンスサンプル調製キットセレクター'. The main content area is a grid of buttons for selecting kit options:

サンプルの種類	シーケンスプロジェクトタイプ	サンプル調製群	サンプル調製オプション
DNA	全ゲノム	TruSeq	TruSeq DNA PCR-Free
RNA	ターゲット濃縮	Nextera	TruSeq NANO DNA
ChIP-Seq	小さいゲノム/プラスミド	上記オプションを 比較	上記オプションを 比較
	アンプリコン	上記オプションを 比較	

Below the grid, there is a section titled 'サンプル調製キット詳細' (Sample Preparation Kit Details) containing the following text:

全ゲノムシーケンスに最適な、必要な試薬をすべて含んだシンプルなキットです。広く使われているサンプル調製ケミストリーをさらに改良したこの新しいワークフローは、PCRを必要とせず、ゲノムカバレッジを向上し、解析が難しい領域もシーケンスが可能です。キットは、ロースループットとハイスループットの2種類をご用意しています。

- カタログ番号:ロースループット
 - FC-121-3001(12種類のインデックスセットA, 24サンプル分)
 - FC-121-3002(12種類のインデックスセットB, 24サンプル分)
- カタログ番号:ハイスループット
 - FC-121-3003(96種類のインデックスセット, 96サンプル分。インデックスはプレート形式です。4回以上の凍結融解を繰り返さないようにご注意ください。このキットは24サンプル単位以上で処理ください。)
- その他の情報は、イルミナの [製品](#) ウェブページをご覧ください。
- プロトコールやキット内容、ベストプラクティスなどの技術的詳細は、下記のサポートページをご覧ください。
 - [ロースループット](#)
 - [ハイスループット](#)

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

MiSeqランのワークフロー

1.

サンプルの準備と、解析するDNAライブラリーの作製



2.

Illumina Experiment Manager (IEM)を用いた
サンプルシートの作成



3.

クラスター形成、MiSeqによるシーケンシング



4.

MiSeq Reporterによるデータ解析

Illumina Experiment Manager とは？

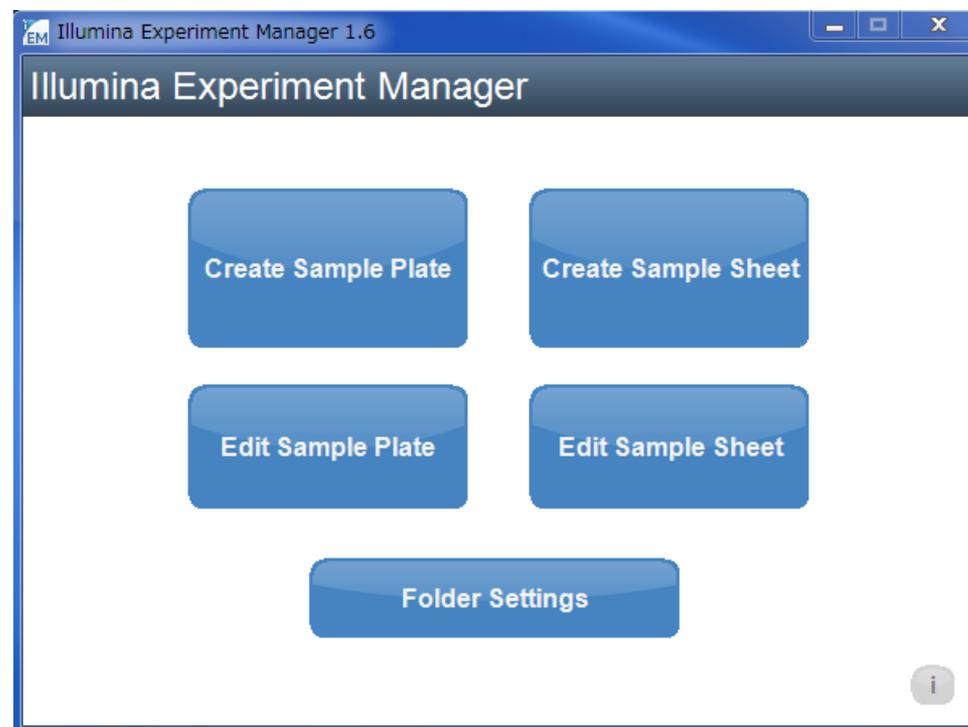
Illumina Experiment Manager (IEM)は、
サンプルシートを作成するためのツールです。

- ▶ フリーソフトウェア (MyIlluminaからダウンロード可能)
- ▶ ウィザードベースで作成
- ▶ 不適切なインデックスの組み合わせを通知

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
- ゲノム



作成はライブラリー調製の前

サンプルシートの作成



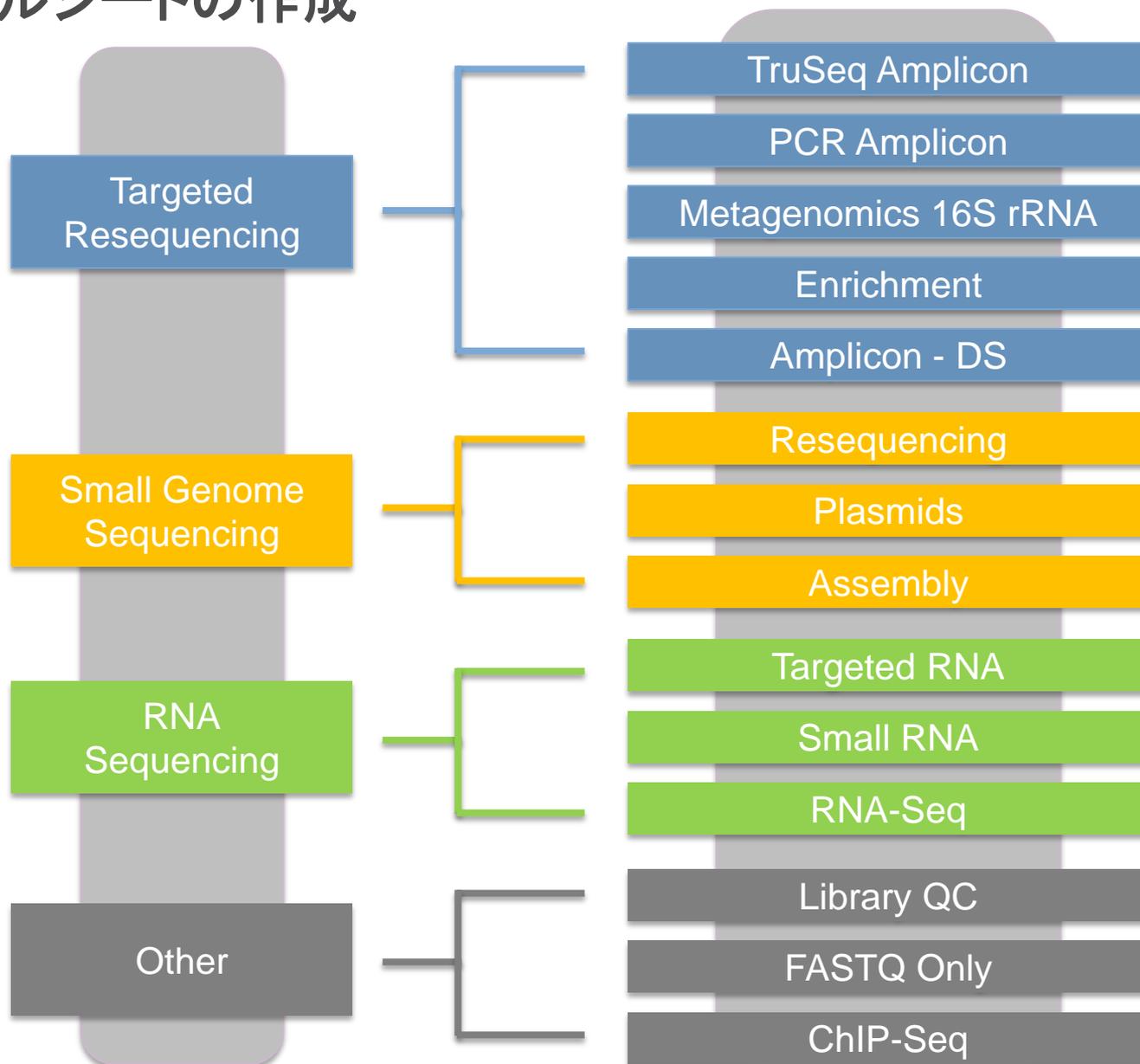
サンプルシートの作成



Categoryの選択

Workflowの選択

サンプルシートの作成



サンプルシートの作成

The screenshot shows the 'Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters' window in the Illumina Experiment Manager. The window is divided into two main sections: 'TruSeq Amplicon Run Settings' and 'TruSeq Amplicon Workflow-Specific Settings'.

TruSeq Amplicon Run Settings:

- Reagent Cartridge Barcode*: [Empty text field]
- Sample Prep Kit: [TruSeq Amplicon dropdown menu]
- Index Reads: [Radio buttons for 0, 1, and 2; 2 is selected]
- Experiment Name: [Empty text field]
- Investigator Name: [Empty text field]
- Description: [Empty text field]
- Date: [2014/06/20 date picker]
- Read Type: [Radio buttons for Paired End and Single Read; Paired End is selected]
- Cycles Read 1: [151 spinner]
- Cycles Read 2: [151 spinner]
- * - required field

TruSeq Amplicon Workflow-Specific Settings:

- Use Somatic Variant Caller (Recommended for Cancer Panel)
- Variant Quality: [30 spinner]

At the bottom of the window, there are three buttons: 'Cancel', 'Back', and 'Next'.

ライブラリー調製に用いたキットの情報、Runのサイクル数、条件を入力する

サンプルシートの作成

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet * - required field Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Sample Project	Description
1	Test1			D701	ATTACTCG		
2	Test2			D703	CGCTCATT		
3	Test3			D705	ATTCAGAA		

Indexの組み合わせが悪い等の場合、Warning が表示される

Sample Sheet Status: **Warning**

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

Buttons: Add Blank Row, Remove Selected Rows, Cancel, Back, Finish

サンプルシートの作成

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet * - required field Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index 1 (I7)*	I7 Sequence	Sample Project	Description
1	Test1			D701	ATTACTCG		
2	Test2			D702	TCGGGAGA		
3	Test3			D704	GAGATTCC		

Sample Sheet Status: **Valid**
Reason:

入力完了: **Valid**

サンプルシートの作成

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	[Header]											
2	IEMFileVersion	4										
3	Date	2014/6/26										
4	Workflow	GenerateFASTQ										
5	Application	FASTQ Only										
6	Assay	TruSeq HT										
7	Description											
8	Chemistry	Default										
9												
10	[Reads]											
11		151										
12												
13	[Settings]											
14	ReverseComplement	0										
15	Adapter	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA										
16	AdapterReverse	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT										
17												
18	[Data]											
19	Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	I7_Index_ID	index	Sample_Pair	Description				
20	1	Test1			D701	ATTACTCG						
21	2	Test2			D703	CGCTCATT						
22	3	Test3			D704	GAGATTCC						
23												
24												
25												
26												
27												

MiSeqランのワークフロー

1.

ライブラリーの調製



2.

illumina Experiment Manager (IEM)を用いた
サンプルシートの作成



3.

クラスター形成、MiSeqによるシーケンシング



4.

MiSeq Reporterによるデータ解析

MiSeqのランに必要なもの



② サンプルシート



④ MiSeq試薬キット



③ フローセル

① 調製したライブラリー

MiSeq試薬キット

- ・ 簡便に使える、使い切りタイプの試薬セットを使用
- ・ わずかな操作だけでシーケンス実施可能



アプリケーションに応じたMiSeq試薬の使い分けが有効

MiSeq試薬タイプ	試薬量	最大対応リード長	リード数	主な用途
V2 – 50 cycle	50 bp	2x26+23 [※] bp	15 M	<ul style="list-style-type: none"> • ショートリードのシーケンス (Small RNAの発現プロファイリング) • Library QC
V2 – 300 cycle	300 bp	2x151+23 [※] bp	15 M	<ul style="list-style-type: none"> • Nextera XTキットを使った各種アプリケーション • PCRアンプリコンの解析 • TruSeq Custom Ampliconとの併用
V2 – 500 cycle	500 bp	2x251+23 [※] bp	15 M	<ul style="list-style-type: none"> • ロングリードの アンプリコンシーケンス • 小型ゲノムのDe novoアセンブリー、など

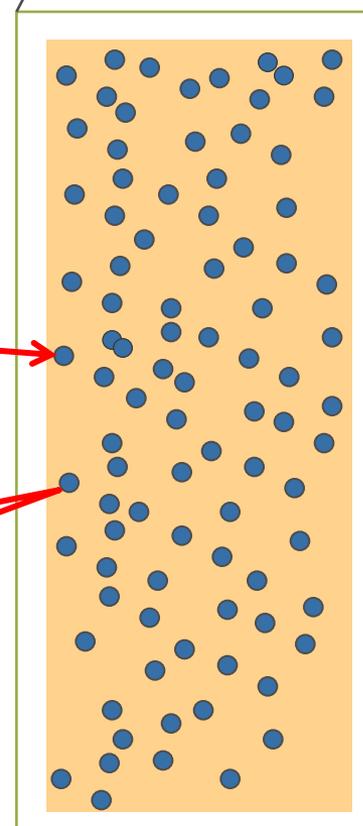
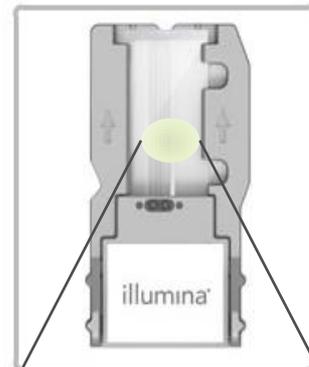
MiSeq試薬タイプ	試薬量	最大対応リード長	リード数	主な用途
V3 - 150 cycle	150 bp	2x76+23 [※] bp	25 M	<ul style="list-style-type: none"> • RNA-seq (トランスクリプトーム) • 少数検体のExome など
V3 – 600 cycle	600 bp	2x301+23 [※] bp	25 M	<ul style="list-style-type: none"> • ロングリードの アンプリコンシーケンス • 微生物のde novoアセンブリー • HLA解析、など

※ dual index分

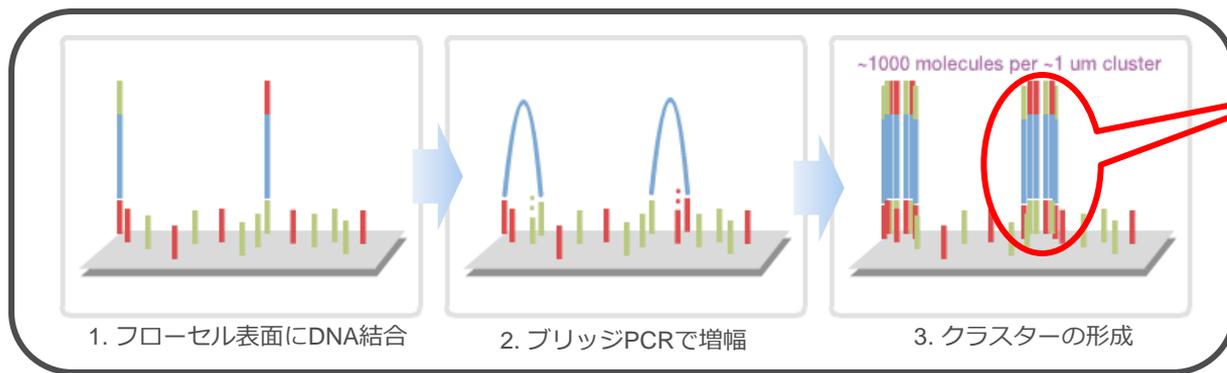
MiSeqラン ～ クラスタ形成 ～

- ▶ クラスタ形成は、シーケンスの際に DNA を検出可能な充分量に増やす目的で行う
- ▶ 各クラスタは増幅された異なる DNA を含む
- ▶ クラスタ形成では 以下の主要なプロセスを経る
 1. ライブラリーのフローセルへのハイブリダイズ
 2. ライブラリーの増幅
 3. Linearize
 4. シーケンスプライマーのハイブリダイズ

Flow Cell



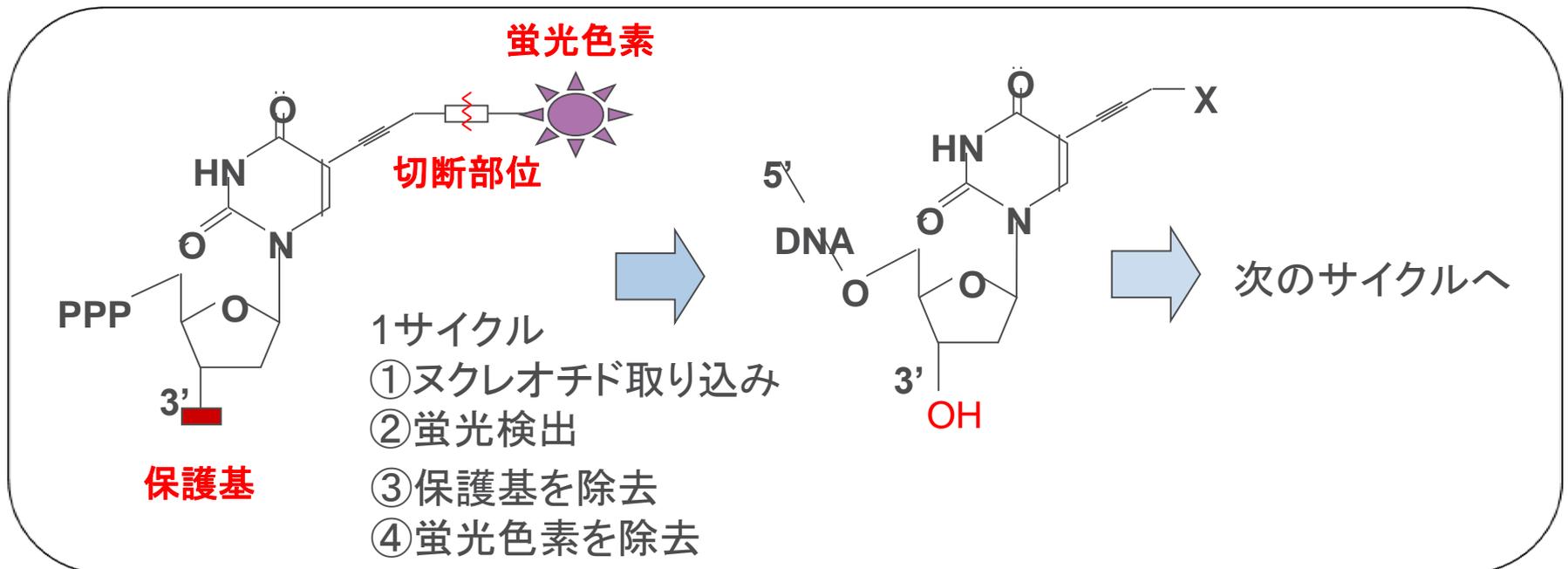
クラスタ



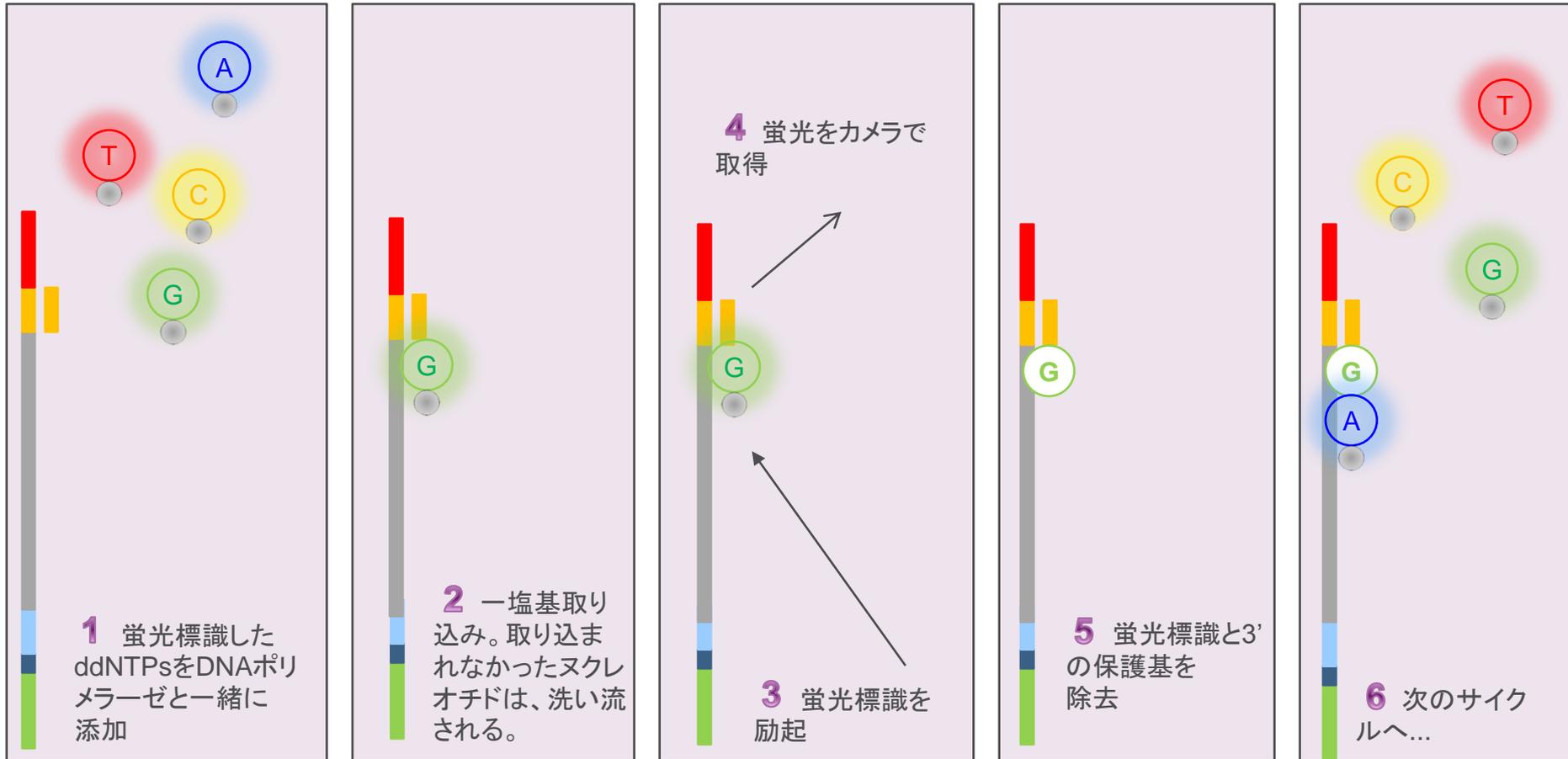
SBS シーケンシングケミストリー

Sequencing By Synthesis (SBS) 法 (サンガー法の改良法)

- ▶ 可逆的ターミネーターを用いて一塩基ずつシーケンスする
- ▶ 3'末端に保護基があるためDNA合成が一塩基ずつストップしながら行われる
- ▶ 1反応に蛍光ラベルされた4ヌクレオチドを加える(蛍光の種類で塩基を特定)
- ▶ 高精度で信頼があり、ホモポリマー領域も正確に解析可能



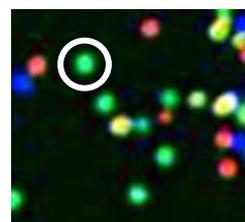
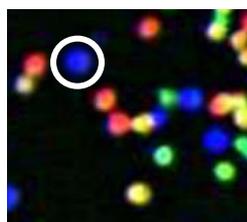
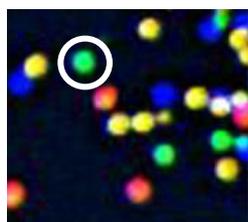
SBS シーケンシングケミストリー



SBS シーケンシングケミストリー

- ▶ Quality scores (Q Scores) がすべての塩基に割り当てられる

サイクル 1-4



= **TGCT**

- ▶ Q scores はそれぞれの塩基が不正確にbase callされる可能性を示す

Q Score	Probability of error
Q30	1 in 1000
Q20	1 in 100

シーケンスの原理

サポートウェビナーシリーズ2013

「イルミナSBS (Sequencing By Synthesis) ケミストリーのご紹介」 2013/07/19



イルミナ
Sequencing By Synthesis (SBS)
ケミストリーのご紹介

小林 孝史
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

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.
Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, DesignStudio, Eco, GAlIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, 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®

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

トラブルシューティング、装置の洗浄

- ▶ 7月11日(金) 予定
- ▶ **トラブルシューティング編:NGS困ったときのお助けツール「Online Troubleshooter」**

- ▶ 7月25日(金) 予定
- ▶ **トラブルシューティング編: MiSeqでフォーカスエラーが出た! どうしたら良い?**

- ▶ 8月 予定
- ▶ **ラン間のサンプル持ち込みを最大限に防ぐためのMiSeqのメンテナンス
～テンプレート洗浄のプロトコール～**

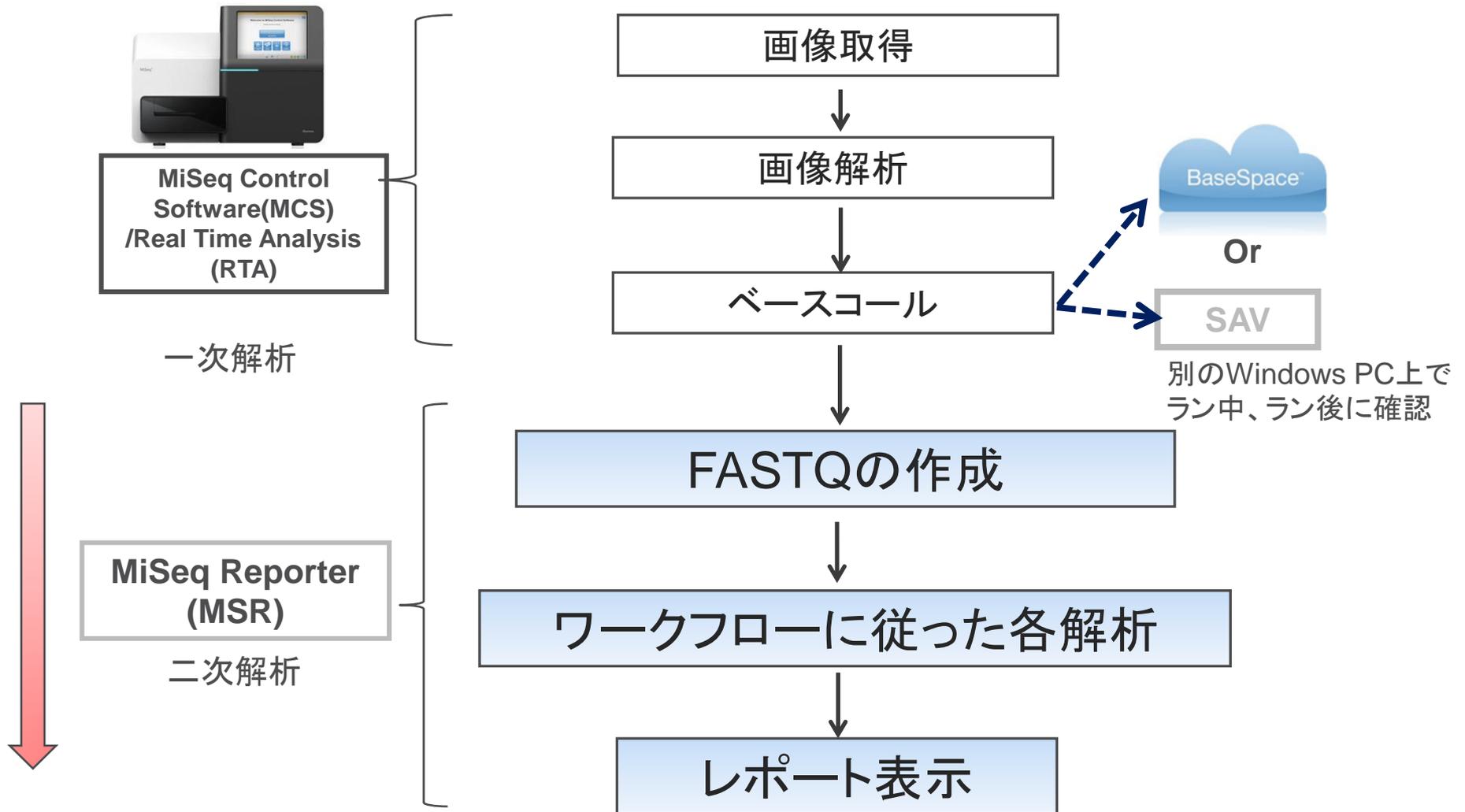
登録リンク: http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn

MiSeqランのワークフロー

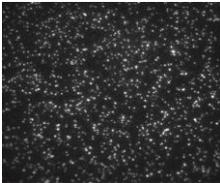
1. サンプルの準備と、解析するライブラリーの作製
2. Illumina Experiment Manager (IEM)を用いた
サンプルシートの作成
3. クラスター形成、MiSeqによるシーケンシング
4. MiSeq Reporterによるデータ解析

MiSeq Reporter (MSR)とは？

- ▶ MiSeq のパイプラインで二次解析以降を担当するソフトウェアです。

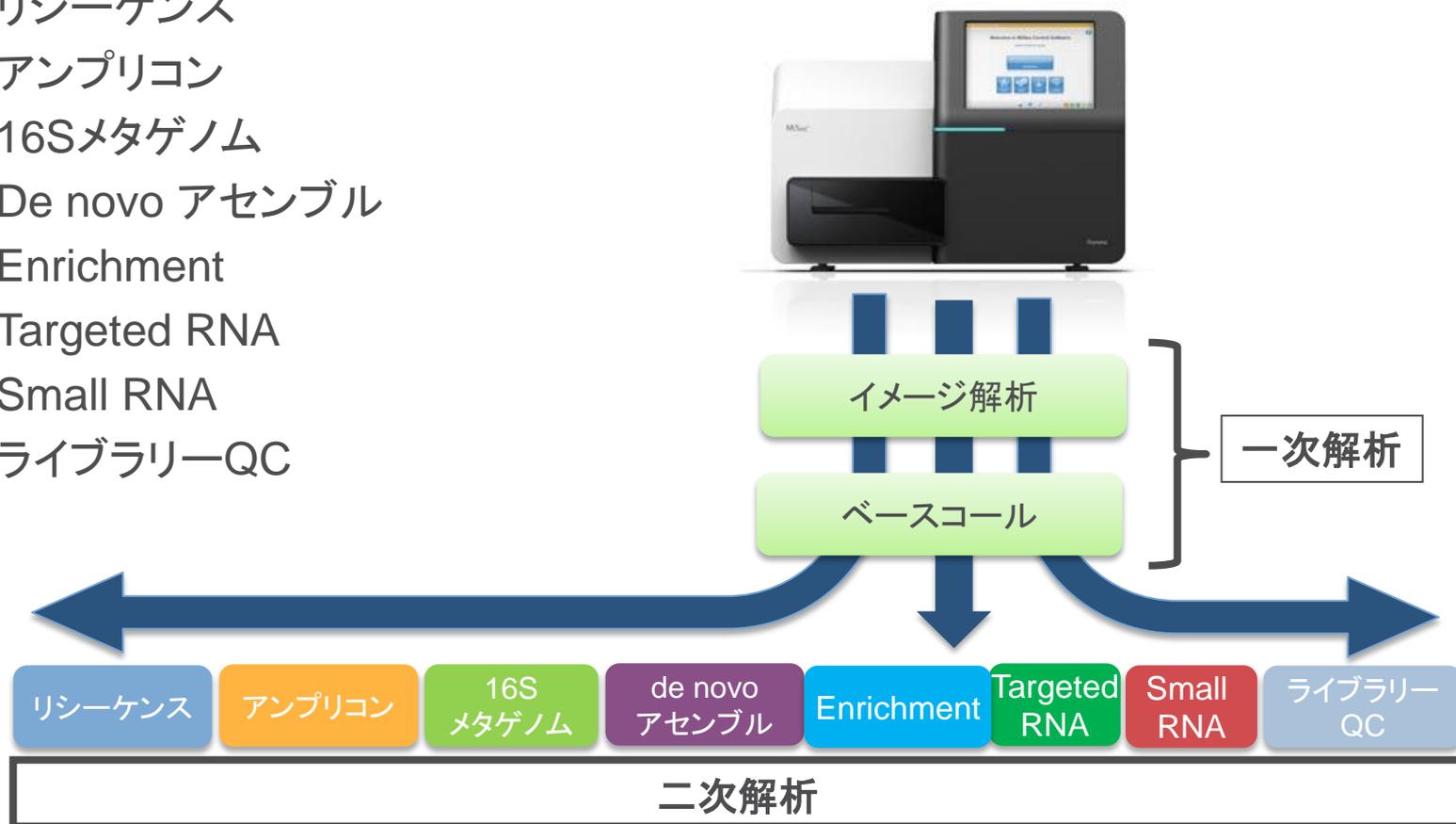


MiSeq 一次解析と二次解析

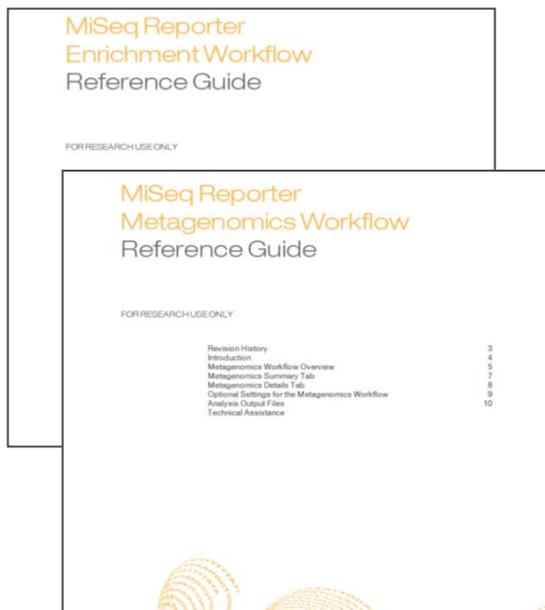
Analysis Type	Outputs	Outputs
<p>Sequencing (MCS)</p>		 <p>Images/TIFF files</p>
<p>Primary Analysis (RTA)</p>		 <p>Intensities Base Calling</p>
<p>Secondary Analysis (MSR or BaseSpace)</p>	 <p>MiSeq Reporter</p>	 <p>Alignments and Variant Detection</p>

MiSeq Reporter (MSR) 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
- Enrichment
- Targeted RNA
- Small RNA
- ライブラリーQC



MiSeq Reporterについて



Reference Guide

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

MiSeq Reporter Theory of Operation

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



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

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

MiSeq Reporter (MSR) ワークフロー概要

- * 全てのワークフローで出力されるわけではありません
- * Resequencing、Enrichment、Metagenomicsワークフローが出力に対応

The image displays a collection of report pages from MiSeq Reporter. On the left, there are two document thumbnails: one labeled 'PDF' and another labeled 'HTML', both showing the 'Resequencing Report' header for sample NA12878_S1. To the right, several overlapping report pages are shown, detailing various metrics:

- Sample Information:** Sample ID: NA12878_S1, Sample Name: NA12878_S1
- Read Statistics:** Table with columns: Read, Percent Aligned, Percent Q30, Mismatch Rate. Data: Read 1 (96.09%, 83.52%, 0.37%), Read 2 (95.42%, 81.01%, 0.46%).
- Coverage Histogram:** A line graph showing the distribution of read coverage.
- Small Variants Summary:** Table with columns: SNVs, Insertions, Deletions. Data: Total Passing (1,489,088 SNVs, 245,114 Insertions, 219,298 Deletions), Percent Found in dbSNP (99.27%, 83.09%, 87.87%), HetHom Ratio, TiTv Ratio.
- Structural Variants Summary:** Table with columns: SV Type, Total, Number in Genes. Data: CNV (74), Inversion (11), Tandem Duplication (3), Deletion (1), Inversion (1).
- Duplicate Information:** Percent Duplicate Pairs: 1.1%.
- Settings:** Table with columns: Setting Name, Value. Data: Reference Genome (Human (UCSC hg19)), Create SLCNV Calling (True), Annotation Source (Ensembl), Min GQ for Variants (30), Max Strand Bias for Variants (10), Flag PCR Duplicates (True).
- Software Versions:** Table with columns: Software, Version. Data: Isaac Whole Genome Sequencing (BaseSpace Workflow) (0.7.0.0), IAS (Analysis Software) (2.4.55.0), Isaac (Alignment) (01.13.10.21), SAMtools (0.1.10 (982.295)), Isaac Variant Caller (2.0.14), IAS (Annotation Service) (VEP 72.4).

レポートに含まれる内容:

リードの統計、カバレッジ、ライブラリー断片長のサマリー、SNV、Insertion / deletion、duplicate %、など。

+ 解析オプションや使用したソフトウェアのバージョン情報

Summary

- ▶ MiSeqは、簡単に操作を行うことができ、ロングリードのアンプリコンシーケンスや、エクソン解析など様々なアプリケーションに対応可能な装置。
- ▶ 使いきりタイプMiSeq試薬キットをシーケンスを行う配列長、用途に合わせて選択し、クラスター形成からシーケンシングまで簡単な操作で実施可能。
- ▶ MiSeq Reporter によって、データの二次解析まで実施することが可能。

サポートウェビナーにご参加いただき
ありがとうございました。

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